

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 1 月 22 日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/007711 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/00, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68, A61K 38/17, 39/395, 45/00, 48/00, 48/00, A61P 3/04, 3/10, 9/10, 43/00, G01N 33/50, 33/15
- (74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市 淀川区十三本町 2 丁目 17 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008690
- (22) 国際出願日: 2003 年 7 月 9 日 (09.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-201856 2002 年 7 月 10 日 (10.07.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松澤 佑次 (MAT-SUZAWA, Yuji) [JP/JP]; 〒665-0804 兵庫県 宝塚市 雲雀丘山手 2 丁目 2 1-2 3 Hyogo (JP). 船橋 徹 (FUNAHASHI, Toru) [JP/JP]; 〒565-0861 大阪府 吹田市 高野台 2 丁目 7-9 Osaka (JP). 下村 伊一郎 (SHIMO-MURA, Ichirou) [JP/JP]; 〒560-0003 大阪府 豊中市 東豊中町 1 丁目 3 3-1 1 Osaka (JP). 古山 直樹 (FURUYAMA, Naoki) [JP/JP]; 〒657-0016 兵庫県 神戸市 灘区篠原台 6-2 Hyogo (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROTEINS AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規蛋白質およびその用途

(57) Abstract: It is intended to provide a novel membrane/secretion protein relating to the differentiation and/or metabolic function of adipocytes, more specifically, an adipocyte-origin secretion/membrane protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 or 22; a nucleic acid encoding it; an antibody against it; a screening method and a screening kit for a preventive/remedy for diseases, in which failures in the differentiation/metabolic function of adipocytes participate, with the use thereof; and a preventive/remedy or a diagnostic for the above these containing the same.

(57) 要約: 本発明は、脂肪細胞の分化および/または代謝機能に関連する新規分泌/膜蛋白質、詳細には、配列番号: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 または 22 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する脂肪細胞由来分泌/膜蛋白質、それをコードする核酸、それに対する抗体、それらを用いた脂肪細胞の分化/代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法・スクリーニング用キット、それらを含む当該疾患の予防・治療剤または診断剤を提供する。

WO 2004/007711 A1

## 明 細 書

## 新規蛋白質およびその用途

## 5 技術分野

本発明は、マウス白色脂肪細胞由来の新規分泌もしくは膜蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNA、並びにそれらの用途に関する。

## 背景技術

- 10 内臓脂肪が蓄積した肥満者は糖尿病や高血圧、動脈硬化などの血管病の確率が高いことで、内臓脂肪蓄積は実際に病態を発症させる引き金となる共通の基盤と考えられる。脂肪蓄積によりおこる病態の発症には脂肪細胞がつくる蛋白質が関係している可能性が考えられるが、脂肪組織に発現する遺伝子には分泌蛋白質遺伝子の頻度が高く、その中には補体、増殖因子等の生理活
- 15 性物質の遺伝子が含まれていることが示されている。このような物質 (adipocytokine と呼ばれる) は、元来脂肪細胞自身の代謝に重要な役割を果たすが、脂肪蓄積時に過剰分泌や逆に分泌不全が起こり個体全体の代謝に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。例えば、下村らは線溶系の重要な調節因子であるプラスミノゲンアクティベーター1 (PAI-
- 20 1) が、脂肪蓄積がおこると特に内臓脂肪で著しく発現量が増加して血中濃度も増加し、血管合併症の成因のひとつとなり得ることを明らかにした [下村 (Shimomura, I.) ら、「ネイチャー・メディシン (Nat. Med.)」、(米国)、第2巻 (第7号)、pp. 800-803 (1996年)]。また、脂肪組織に特異的かつ高頻度に発現していた遺伝子 adipose most abundant
- 25 gene transcript-1 はコラーゲン様の蛋白質 (adiponectin) をコードしており、この物質はヒトの血中に多量存在し、血管平滑筋細胞の増殖を強く抑制する作用を持っているが、肥満者では血中レベルが逆に低下しており血管病へとつながることがわかってきている [有田 (Arita, Y.) ら、「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ

(Biochem. Biophys. Res. Commun.)」、(米国)、第257巻(第1号)、  
pp. 79-83 (1999年)]。

また、脂肪細胞は多量の脂肪を合成するとともに脂肪分解も活発に行っており、血中に脂肪酸とグリセロールを放出するが、栗山らがクローニングした膜蛋白質 aquaporin adipose は脂肪細胞でグリセロールチャネル分子として機能する可能性が示唆されている[岸田 (Kishida, K.) ら、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)」、(米国)、第275巻(第27号)、pp. 20896-20902 (2000年)]。

このように脂肪細胞は様々な生理活性物質(即ち、リガンド)を分泌し、  
10 また、膜蛋白質(即ち、レセプター)を細胞表面に発現している。したがって、これらの分泌・膜蛋白質の発現もしくは生理活性を調節することによって、新規な肥満、糖尿病、血管病(例、動脈硬化)の予防・治療法が開発されることが期待される。

従来、細胞表面レセプターと生理活性物質(即ち、リガンド)との結合を  
15 阻害する物質や、結合して生理活性物質(即ち、リガンド)と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品に活用されてきた。従って、このように生体内での発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうる膜レセプター蛋白質およびそのリガンド分子(例えば、  
20 分泌蛋白質)を新規に見出し、その遺伝子(例えばcDNA)をクローニングすることは、新規レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す、もしくは新規分泌蛋白質の特異的レセプターを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、脂肪細胞で分泌もしくは細胞表面に発現する蛋白質はその全てが  
25 見出されているわけではなく、現時点でもなお未知の分泌・膜蛋白質が多数存在しており、新たなリガンド、レセプターの探索および機能解明が切望されている。

したがって、本発明は、肥満、糖尿病、動脈硬化などの予防・治療薬開発の有用なツール、あるいはこれらの疾患の有用な診断マーカーとなり得るよ

うな、脂肪細胞で特異的もしくは高発現している新規分泌・膜蛋白質遺伝子を同定することを目的とする。さらに、本発明は、該新規遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該形質転換体を培養することによる該分泌・膜蛋白質の製造方法、該分泌・膜蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該分泌・膜蛋白質の発現量を変化させる化合物、該分泌・膜蛋白質に対して特異的親和性を有する生体物質の決定方法、該特異的親和性を有する生体物質と該分泌・膜蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られる該特異的親和性を有する生体物質と該分泌・膜蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、および該特異的親和性を有する生体物質と該分泌・膜蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該分泌・膜蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の目的を達成すべく、高脂肪食負荷マウスの内蔵脂肪組織由来のcDNAライブラリーを作製し、該cDNAをN末端の細胞外領域を欠失させた恒常的活性型トロンボポイエチン受容体（498位のセリンがアスパラギンに置換されている）cDNAの5'側に組み込んだレトロウイルス発現ライブラリーを構築、パッケージング細胞から高力価レトロウイルスを回収してマウスプロB細胞株（Ba/F3）を感染させ、増殖性を保持した細胞を選択した。選択された細胞からゲノムDNAを抽出、PCR法を用いて導入されたマウス脂肪細胞由来cDNAをサブクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、8つの未知分泌もしくは膜蛋白質をコードすると考えられるcDNA断片が同定された。これらのcDNA断片を用いて、マウス脂肪細胞由来cDNAから蛋白質コード領域の全長を含むcDNAクローンを単離し、それらの塩基配列を決定したところ、いずれも新規



遺伝子であることが分かった。

さらに、これら遺伝子の発現の組織特異性、肥満・糖尿病モデルにおける発現量の変動、食餌に対する応答、インスリン抵抗性惹起因子もしくは改善薬に対する応答、脂肪細胞分化に及ぼす効果等を解析した結果、これらの遺  
5 伝子は脂肪細胞の分化や糖・脂質代謝機能に関連することが明らかとなった。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

10 [1] 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

[2] 上記[1]記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

15 [3] 上記[2]記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

[4] 上記[1]記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

[5] 配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

20 [6] 上記[5]記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

[7] 上記[6]記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

25 [8] 上記[5]記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

[9] 配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

[10] 上記[9]記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配

列を含むポリヌクレオチド；

〔11〕 上記〔10〕 記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

5   〔12〕 上記〔9〕 記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

〔13〕 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

10   〔14〕 上記〔13〕 記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

〔15〕 上記〔14〕 記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

15   〔16〕 上記〔13〕 記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

〔17〕 配列番号：10で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

〔18〕 上記〔17〕 記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

20   〔19〕 上記〔18〕 記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

〔20〕 上記〔17〕 記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

25   〔21〕 配列番号：12で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

〔22〕 上記〔21〕 記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

〔23〕 上記〔22〕 記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結

果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

〔24〕 上記〔21〕記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

- 5     〔25〕 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

〔26〕 上記〔25〕記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

- 〔27〕 上記〔26〕記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；
- 10

〔28〕 上記〔25〕記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

- 〔29〕 配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；
- 15

〔30〕 上記〔29〕記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

- 〔31〕 上記〔30〕記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；
- 20

〔32〕 上記〔29〕記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

〔33〕 配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

- 〔34〕 上記〔33〕記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- 25

〔35〕 上記〔34〕記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

[36] 上記[33]記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

[37] 配列番号：20で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

5 [38] 上記[37]記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

[39] 上記[38]記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

10 [40] 上記[37]記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

[41] 配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩；

15 [42] 上記[41]記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

[43] 上記[42]記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド；

20 [44] 上記[41]記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体；

[45] 上記[1]、[5]、[9]、[13]、[17]、[21]、[25]、[29]、[33]、[37]または[41]記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬；

25 [46] 上記[2]、[6]、[10]、[14]、[18]、[22]、[26]、[30]、[34]、[38]または[42]記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬；

[47] 上記[3]、[7]、[11]、[15]、[19]、[23]、[27]、[31]、[35]、[39]または[43]記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬；

[48] 上記[4]、[8]、[12]、[16]、[20]、[24]、  
[28]、[32]、[36]、[40]または[44]記載の抗体を含有  
してなる医薬；

- 5 [49] 脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の予  
防・治療剤である上記[45]～[48]のいずれかに記載の医薬；

[50] 上記[2]、[6]、[10]、[14]、[18]、[22]、  
[26]、[30]、[34]、[38]もしくは[42]記載のポリヌク  
レオチドまたはその一部を含有してなる診断薬；

- 10 [51] 上記[3]、[7]、[11]、[15]、[19]、[23]、  
[27]、[31]、[35]、[39]または[43]記載のポリヌクレ  
オチドを含有してなる診断薬；

[52] 上記[4]、[8]、[12]、[16]、[20]、[24]、  
[28]、[32]、[36]、[40]または[44]記載の抗体を含有  
してなる診断薬；

- 15 [53] 脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の診  
断用である上記[50]～[52]のいずれかに記載の診断薬；

- [54] 上記[1]、[5]、[9]、[13]、[17]、[21]、  
[25]、[29]、[33]、[37]または[41]記載の蛋白質もし  
くはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを含む、該蛋白質またはそ  
20 の塩に対して特異的親和性を有する化合物またはその塩、あるいは該蛋白質  
またはその塩と該化合物またはその塩との結合性を变化させる化合物または  
その塩のスクリーニング方法；

- [55] 上記[1]、[5]、[9]、[13]、[17]、[21]、  
[25]、[29]、[33]、[37]または[41]記載の蛋白質もし  
25 くはその部分ペプチドまたはその塩を含んでなる、該蛋白質またはその塩に  
対して特異的親和性を有する化合物またはその塩、あるいは該蛋白質または  
その塩と該化合物またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩  
のスクリーニング用キット；

[56] 上記[54]記載の方法または上記[55]記載のキットを用いて

得られうる化合物またはその塩を含有してなる医薬；

〔57〕脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である上記〔56〕記載の医薬；

5   〔58〕上記〔2〕、〔6〕、〔10〕、〔14〕、〔18〕、〔22〕、  
〔26〕、〔30〕、〔34〕、〔38〕もしくは〔42〕記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、上記〔1〕、〔5〕、  
〔9〕、〔13〕、〔17〕、〔21〕、〔25〕、〔29〕、〔33〕、  
〔37〕または〔41〕記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法；

10   〔59〕上記〔2〕、〔6〕、〔10〕、〔14〕、〔18〕、〔22〕、  
〔26〕、〔30〕、〔34〕、〔38〕もしくは〔42〕記載のポリヌクレオチドまたはその一部を含んでなる、上記〔1〕、〔5〕、〔9〕、〔13〕、  
〔17〕、〔21〕、〔25〕、〔29〕、〔33〕、〔37〕または〔41〕記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット；

15   〔60〕上記〔58〕記載の方法または上記〔59〕記載のキットを用いて得られうる化合物またはその塩を含有してなる医薬；

〔61〕脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である上記〔60〕記載の医薬；

20   〔62〕上記〔4〕、〔8〕、〔12〕、〔16〕、〔20〕、〔24〕、  
〔28〕、〔32〕、〔36〕、〔40〕または〔44〕記載の抗体を用いることを特徴とする、細胞膜もしくは細胞外液における上記〔1〕、〔5〕、  
〔9〕、〔13〕、〔17〕、〔21〕、〔25〕、〔29〕、〔33〕、  
〔37〕または〔41〕記載の蛋白質またはその塩の量を変化させる化合物  
25   またはその塩のスクリーニング方法；

〔63〕上記〔4〕、〔8〕、〔12〕、〔16〕、〔20〕、〔24〕、  
〔28〕、〔32〕、〔36〕、〔40〕または〔44〕記載の抗体を含んでなる、細胞膜もしくは細胞外液における上記〔1〕、〔5〕、〔9〕、  
〔13〕、〔17〕、〔21〕、〔25〕、〔29〕、〔33〕、〔37〕

または〔4 1〕記載の蛋白質またはその塩の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット；

〔6 4〕上記〔6 2〕記載の方法または上記〔6 3〕記載のキットを用いて得られうる化合物またはその塩を含有してなる医薬；および

- 5   〔6 5〕脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である上記〔6 4〕記載の医薬；  
などを提供する。

本発明の蛋白質は、高脂肪食負荷により白色脂肪細胞で発現する分泌もしくは膜蛋白質であることなどから、脂肪細胞の分化や代謝機能の異常に関連  
10   する疾患の予防・治療剤として、あるいは当該疾患の予防・治療に有効な医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして優れた効果を発揮する。

発明を実施するための最良の形態

- 15   本発明は、高脂肪食負荷されたヒトまたは他の哺乳動物の白色脂肪組織で特異的に、もしくは高発現する分泌もしくは膜蛋白質（以下、これらを総称して「本発明の蛋白質」という場合がある）を提供する。具体的には、本発明の蛋白質は、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質（以下、「SST20-14(Long form)」と  
20   いう場合もある）；配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質（以下、「SST20-14(Short form)」という場合もある）；配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質（以下、「SST22-22(Long form)」という場合もある）；配列番号：8で表わされるアミノ酸  
25   配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質（以下、「SST22-22(Short form)」という場合もある）；配列番号：10で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質（以下、「SST8-5」という場合もある）；配列番号：12で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質（以下、

「SST19-15(Long form)」という場合もある) ; 配列番号 : 14 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質 (以下、「SST19-15(Short form)」という場合もある) ; 配列番号 : 16 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質 (以下、「SST13-11」という場合もある) ; 配列番号 : 18 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質 (以下、「SST9-8」という場合もある) ; 配列番号 : 20 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質 (以下、「SST21-3」という場合もある) ; または配列番号 : 22 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質 (以下、「SST20-6」という場合もある) である。

本発明の蛋白質は、哺乳動物の脂肪組織、特に白色脂肪組織で高発現する分泌もしくは膜蛋白質であるが、上記の性質を有する限りその由来に特に制限はなく、例えば、哺乳動物 (例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) の細胞 [例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など] もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織 [例えば、脳、脳の各部位 (例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髓、副腎、皮膚、肺、消化管 (例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織 (例、褐色脂肪組織、白色脂肪組織)、骨格筋など] 等から単離・精製される蛋白質であってもよい。また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で生化学的に合成された蛋白質であって



もよいし、あるいは上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を導入された形質転換体から産生される組換え蛋白質であってもよい。

上記「実質的に同一のアミノ酸配列」としては、上記各配列番号（配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20または22）で  
5 表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得る  
10 ものである）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合（%）を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸（Phe、Trp、Tyr）、脂肪族アミノ酸（Ala、Leu、Ile、Val）、極性  
15 アミノ酸（Gln、Asn）、塩基性アミノ酸（Lys、Arg、His）、酸性アミノ酸（Glu、Asp）、水酸基を有するアミノ酸（Ser、Thr）、側鎖の小さいアミノ酸（Gly、Ala、Ser、Thr、Met）などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換は蛋白質の表現型に変化をもたらさない（即ち、保存的アミノ酸置換である）ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載  
20 されている（例えば、Bowieら、Science、247：1306-1310（1990）を参照）。

本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST（National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool）を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許  
25 す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。アミノ酸配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90：5873-5877（1993）に記載のアルゴリズム〔該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム（version 2.0）に組み込まれている（Altschulら、Nucleic Acids Res.,

25 : 3389-3402 (1997)) ]、Needleman ら, J. Mol. Biol., 48 : 444-453 (1970)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは GCG ソフトウェアパッケージ中の GAP プログラムに組み込まれている]、Myers および Miller, CABIOS, 4: 11-17 (1988)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは CGC 配列アライ  
5 ンメントソフトウェアパッケージの一部である ALIGN プログラム (version 2.0) に組み込まれている]、Pearson ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448 (1988)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは GCG ソフトウェアパッケージ中の FASTA プログラムに組み込まれている] 等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

10 より好ましくは、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、上記各配列番号で表されるアミノ酸配列と約 60%以上、好ましくは約 70%以上、さらに好ましくは約 80%以上、特に好ましくは約 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

「実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質」としては、例えば、前  
15 記した「実質的に同一のアミノ酸配列」を含有し、且つ上記各配列番号で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質が好ましい。

「実質的に同質の活性」としては、例えば、レセプター（もしくはリガンド）結合活性およびシグナル情報伝達作用などが挙げられる。「実質的に同  
20 質」とは、それらの活性が性質的に（例：生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、レセプター（リガンド）結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例：約 0.5～約 2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異な  
っていてもよい。

25 レセプター（もしくはリガンド）結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述する特異的親和性を有する生体物質（レセプターもしくはリガンド）の決定方法やアゴニスト、アンタゴニストのスクリーニング方法において用いられる方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、例えば、①上記各配列番号で表されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②上記各配列番号で表されるアミノ酸配列に1または2  
5 個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③上記各配列番号で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④上記各配列番号で表されるアミノ  
10 酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質であって、且つ上記各配列番号で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質も含まれる。ここで  
15 「実質的に同質の活性」とは前記と同義である。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、蛋白質の活性が保持される限り特に限定されない。

本発明の蛋白質は分泌もしくは膜蛋白質であり、通常、生体内ではN末端  
20 にシグナルペプチドを有する前駆ポリペプチドとして翻訳された後、シグナルペプチダーゼによるプロセッシングを受けて成熟（もしくはプロ）蛋白質となる。シグナルペプチドの開裂部位（成熟（プロ）蛋白質のN末端）は、例えば、完全もしくは部分精製した本発明の蛋白質をエドマン分解法に付すことにより決定することができるが、前駆ポリペプチドの一次構造から公知  
25 の数学的アルゴリズムを用いて予測することができる。このようなアルゴリズムとしては、例えば、Nielsenら、Int. Neural Syst., 8(5-6): 581-599 (1997)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはSignalPプログラム (WWWサーバー: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>上で利用可能) に組み込まれている]、Emanuelssonら、J. Mol. Biol. 300: 1005-1016 (2000)

に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは TargetP プログラム (WWW サーバー : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> 上で利用可能) に組み込まれている]、von Heijne, Nucl. Acids Res., 14: 4683 (1986) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは PSORT II プログラム (WWW サーバー : <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html> 上で利用可能) に組み込まれている]、SOSUI (Signal) プログラム Beta Version (WWW サーバー : [http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosuisignal/sosuisignal\\_submit.html](http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosuisignal/sosuisignal_submit.html) 上で利用可能) に組み込まれるアルゴリズム等が挙げられるが、これらに限定されない。例えば

10 上記 PSORT II プログラムを用いた場合、上記各配列番号で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドはそれぞれアミノ酸番号 - 1 とアミノ酸番号 1 の間で開裂し得ると予測されるが、それらは現実の開裂部位と必ずしも一致するわけではなく、また、本発明の蛋白質を発現させる細胞種によってシグナルの切断位置が異なる場合も起こり得る。従って、本発明の蛋白質には、

15 上記各配列番号で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列、あるいは該アミノ酸配列において 1 または 2 個以上のアミノ酸が付加もしくは欠失したアミノ酸配列を含有する蛋白質も包含される。

本発明の蛋白質は、好ましくは、配列番号 : 2 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST20-14 (Long form)、配列番号 : 4 で表されるアミノ酸配列

20 を有するマウス SST20-14 (Short form)、配列番号 : 6 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST22-22 (Long form)、配列番号 : 8 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST22-22 (Short form)、配列番号 : 10 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST8-5、配列番号 : 12 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST19-15 (Long form)、配列番号 : 14 で表されるアミノ酸配列

25 を有するマウス SST19-15 (Short form)、配列番号 : 16 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST13-11、配列番号 : 18 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST9-8、配列番号 : 20 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST21-3 または配列番号 : 22 で表されるアミノ酸配列を有するマウス SST20-6、あるいは他の哺乳動物におけるそれらのホモログである。

本明細書において、蛋白質およびペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）で記載される。配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする、本発明の蛋白質は、C  
5 末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基；例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基； $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基；ピパロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明の蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の蛋白質には、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$   
20 アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成し得るN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されて  
25 いるもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の蛋白質の部分ペプチド（以下、単に「本発明の部分ペプチド」と略称する場合もある）は、上記した本発明の蛋白質の部分アミノ酸配列を有するペプチドであり、且つ本発明の蛋白質と実質的に同質の活性を有する限

り、何れのものであってもよい。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同意義を示す。また、「実質的に同質の活性」の測定は本発明の蛋白質の場合と同様に行なうことができる。

具体的には、本発明の部分ペプチドとして、例えば、上記各配列番号で表  
5 されるアミノ酸配列のうち、本発明の蛋白質と相互作用し得る生体物質（レセプターもしくはリガンド）との結合に関わる領域および該相互作用を介したシグナル伝達に関わる領域をさらに含む部分アミノ酸配列を有するものなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドとしては、少なくとも30個以上、好ましくは60  
10 個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸を有するペプチドなどが好ましい。

一方、本発明の蛋白質の部分アミノ酸配列を含むが該蛋白質と実質的に同質の活性を有しないペプチド、例えば、上記各配列番号で表されるアミノ酸配列のうち、本発明の蛋白質と相互作用し得る生体物質（レセプターもしくは  
15 はリガンド）との結合に関わる領域を含むが、該相互作用を介したシグナル伝達に関わる領域を含まない部分アミノ酸配列を有するものなどは、「本発明の部分ペプチド」には含まれない。しかしながら、かかるペプチドは、本発明の蛋白質と相互作用し得る生体物質（レセプターもしくはリガンド）と結合して該蛋白質によるシグナル伝達作用を遮断することができるので、該  
20 シグナル伝達の異常亢進が関与する病態・疾患の予防・治療などに有用であり得る。

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、  
25 本発明の蛋白質について前記したと同様のものが挙げられる。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば、C末端のエステルと同様のものなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明の蛋白質と同様に、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、前述した哺乳動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することができる。具体的には、本発明の蛋白質が細胞膜に局在する場合は、哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズし、低速遠心により細胞デブリスを除去した後、上清を高速遠心して細胞膜含有画分を沈澱させ（必要に応じて密度勾配遠心などにより細胞膜画分を精製し）、該画分を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー等に付すことにより該蛋白質またはその塩を調製することができる。また、本発明の蛋白質が細胞外に分泌される場合は、哺乳動物の組織または細胞を適当な培地中で培養した後、濾過または遠心分離等により培養上清を分取し、該上清を上記と同様にクロマトグラフィー等に付すことにより該蛋白質またはその塩を調製することができる。

本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、「本発明の蛋白質（ペプチド）」と略記する場合がある）は、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。本発明の蛋白質（ペプチド）を構成し得る部分ペプチドもしくはアミ

ノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とする蛋白質を製造することができる。

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の①～⑤に記載された方法に従って行われる。

- 5 ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)  
②Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)  
③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)  
10 ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学 IV、205、(1977 年)  
⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広川書店

- このようにして得られた蛋白質 (ペプチド) は、公知の精製法により精製単離することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、  
15 カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

- 上記方法で得られる蛋白質 (ペプチド) が遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に蛋白質 (ペプチド) が塩として得られた場合には、該塩を  
20 公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

- 本発明の蛋白質 (ペプチド) の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4  
25 -ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル) フェノキシ樹脂などを挙げることができる。こ



のような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質（ペプチド）の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質等を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質（ペプチド）またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒は、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどのアミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸を

アセチル化することができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

- 5      原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。
- 10      カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエ
- 15      ステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

- セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護
- 20      することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

- 25      チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキ

シメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸
- 5 あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、
- 10 パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1,
- 15 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、
- 20 シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 25 蛋白質（ペプチド）のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質（ペプチド）とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質（ペプチド）とを製造し、この両

蛋白質（ペプチド）を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質（保護ペプチド）を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質（粗ペプチド）を得ることができる。この粗蛋白質（粗ペプチド）は  
5 既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質（ペプチド）のアミド体を得ることができる。

蛋白質（ペプチド）のエステル体は、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、上記蛋白質（ペプチド）のアミド体の場合と同様にして得ることができる。  
10

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、本発明の蛋白質またはその塩を適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。

さらに、本発明の蛋白質（ペプチド）は、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養し、得られる培養物から本発明の蛋白質（ペプチド）を分離精製することによって製造することもできる。本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドはDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該ポリヌクレオチドは二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。  
15  
20

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、サル、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ハムスターなど）のゲノムDNA、該哺乳動物のあらゆる細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 $\beta$ 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、  
25

- ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など] もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織[例えば、脳、脳の各部位 (例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髓、副腎、皮膚、肺、消化管 (例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織 (例、褐色脂肪組織、白色脂肪組織)、骨格筋など] 由来の cDNA、
- 5 合成DNAなどが挙げられる。本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNA画分および全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction (以下、「PCR法」と略称する) およびReverse Transcriptase-PCR (以下、「RT-PCR法」と略称する)
- 10 によって直接増幅することもできる。あるいは、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNAおよび全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリーおよびcDNAライブラリーから、コロニーもしくはブランクハイブリダイゼーション
- 15 法またはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。
- 20

- 本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：1で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェント
- 25 な条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA (以下、「Sst120-14(Long form)」と略記する場合がある) ; 配列番号：3で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番

- 号：4で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst20-14(Short form)」と略記する場合がある）；配列番号：5で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配
- 5 列を含有し、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst22-22(Long form)」と略記する場合がある）；配列番号：7で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：8で表されるアミノ酸配列
- 10 を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst22-22(Short form)」と略記する場合がある）；配列番号：9で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質
- 15 をコードするDNA（以下、「Sst8-5」と略記する場合がある）；配列番号：11で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst19-15(Long form)」と略記する場合がある）；配列番号：13で表される塩基配列を含有するDNAまたは
- 20 該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst19-15(Short form)」と略記する場合がある）；配列番号：15で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下で
- 25 ハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：16で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst13-11」と略記する場合がある）；配列番号：17で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな

条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst9-8」と略記する場合がある）；配列番号：19で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：20で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst21-3」と略記する場合がある）または配列番号：21で表される塩基配列を含有するDNAまたは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：22で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNA（以下、「Sst20-6」と略記する場合がある）が挙げられる。

上記各配列番号（配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19または21）で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、当該塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、特に好ましくは約80%以上、最も好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本明細書における塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=0N；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。塩基配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、上記したアミノ酸配列の相同性計算アルゴリズムが同様に好ましく例示される。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 第2版 (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、

ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件としては、例えば、ナトリウム塩濃度が約 1  
5 9～約 40 mM、好ましくは約 19～約 20 mMで、温度が約 50～約 70℃、好ましくは約 60～約 65℃の条件等が挙げられる。特に、ナトリウム塩濃度が約 19 mMで温度が約 65℃の場合が好ましい。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応  
10 の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

本発明の蛋白質をコードするDNAは、好ましくは、配列番号：1で表される塩基配列を有する、マウス SST20-14(Long form)蛋白質をコードするDNA、配列番号：3で表される塩基配列を有する、マウス SST20-14(Short  
15 form)蛋白質をコードするDNA、配列番号：5で表される塩基配列を有する、マウス SST22-22(Long form)蛋白質をコードするDNA、配列番号：7で表される塩基配列を有する、マウス SST22-22(Short form)蛋白質をコードするDNA、配列番号：9で表される塩基配列を有する、マウス SST8-5蛋白質をコードするDNA、配列番号：11で表される塩基配列を有する、マウス SST19-15(Long form)蛋白質をコードするDNA、配列番号：13で表  
20 される塩基配列を有する、マウス SST19-15(Short form)蛋白質をコードするDNA、配列番号：15で表される塩基配列を有する、マウス SST13-11蛋白質をコードするDNA、配列番号：17で表される塩基配列を有する、マウス SST9-8蛋白質をコードするDNA、配列番号：19で表される塩基配列を有する、マウス SST21-3蛋白質をコードするDNA、または配列番号：21で表される塩基配列を有する、マウス SST20-6蛋白質をコードするDNAなどである。

上記各DNAをプラスミドとして保持する大腸菌株〔順に(1) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST20-14long form)、(2) Escherichia



coli Top10/pCR4-TOP0(SST20-14short form)、(3) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST22-22long form)、(4) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST22-22short form)、(5) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST8-5)、(6) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST19-15long form)、(7) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST19-15short form)、(8) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST13-11)、(9) Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0(SST9-8)、(10) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST21-3)および(11) Escherichia coli Top10/pCR4-TOP0(SST20-6)] は、それぞれ FERM BP-8406、FERM BP-8407、FERM BP-8408、FERM BP-8409、FERM BP-8402、FERM BP-8404、FERM BP-8405、FERM BP-8403、FERM BP-8411、FERM BP-8413 および FERM BP-8412 の受託番号を付され、(1)～(8)については平成15(2003)年6月20日付で、(9)～(11)については平成15(2003)年6月24日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に寄託されている。

本発明の蛋白質のような分泌もしくは膜蛋白質をコードする核酸をクローニングする簡便な手法としてシグナルシーケンストラップ(SST)法が知られている。この方法は、基本的には、目的の組織由来のcDNAライブラリーを作製し、これを分泌もしくは細胞膜へ移行した場合にのみ細胞の選択を可能にする蛋白質をコードするDNAの5'側に組み込んだ融合蛋白質発現ベクターを用い、該蛋白質の分泌もしくは細胞膜への移行を指標にして分泌もしくは膜蛋白質をコードするcDNAを選択するというものである。例えば、スクロースを資化できない変異インペルターゼを有する酵母に、目的cDNAライブラリーをシグナル配列欠失変異インペルターゼ遺伝子の5'側に融合させた酵母発現プラスミドを導入し、スクロースを炭素源とする培地で増殖性を有する酵母を選択する方法(Kleinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7108-7113, 1996)、シグナル欠損変異CD25抗原遺伝子の5'側に目的cDNAライブラリーを融合させた哺乳動物用発現ベクターを適当な哺乳動物細胞に導入し、抗CD25抗体を用いた免疫染色により分

泌・膜蛋白質をコードするcDNAを有するクローンを選択する方法

- (Tashiro ら, Science, 261: 600-603, 1993)、Ba/F3細胞株をIL-3非依存的に増殖可能にする変異トロンボポイエチン受容体(N末端細胞外ドメインコード領域を欠失する)の5'側に目的cDNAライブラリーを融合させた哺乳動物用発現ベクターをBa/F3細胞に導入し、IL-3非存在下で増殖性を有する細胞を選択する方法(Kojima および Kitamura, Nature Biotech., 17: 487-490, 1999; Tsuruga ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 272: 293-297, 2000)等が挙げられる。

- 選択された細胞からゲノムDNA(導入されたcDNAがゲノムに組み込まれている場合)またはプラスミドDNAもしくはウイルスDNA(導入されたcDNAがゲノムに組み込まれていない場合)を抽出し、使用したベクターの5'フランキング配列と融合させたマーカー蛋白質遺伝子の5'側配列とを基にしてセンスおよびアンチセンスプライマーを作製し、前記DNAを鋳型としてPCR法を行うことにより分泌もしくは膜蛋白質の一部をコードするcDNAを単離し、適当なクローニングベクター中にサブクローニングすることができる。

こうして得られたcDNAの塩基配列は自体公知の方法(マキシム・ギルバート法、ジデオキシターミネーション法等)を用いて決定することができる。

- 本発明の蛋白質をコードする核酸のクローニングの手段としては、上記のようにして同定され、配列決定された上記cDNAの部分塩基配列を有する2種の合成DNAプライマーと適当なアダプタープライマーとを用いて、目的の組織由来のmRNAを鋳型とする5'-および3'-RACE反応を行い、得られた各増幅断片を制限酵素とリガーゼを用いて連結するなどして完全長のcDNAを得る方法、あるいは配列決定された上記cDNAの一部あるいは全領域を含むDNAをプローブとして用い、ライブラリーから再度ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行って完全長cDNAを得る方法等が挙げられるが、これらに限定されない。RACE法による場合、アダプタープライマーとしては任意のアダプター配列(例えば、サブクローニ

ング用の制限酵素認識部位を含む配列)の3'末端にオリゴdTが付加されたもの等が好ましく用いられ得る。5'-RACEにおいて、逆転写酵素の内在のターミナルトランスフェラーゼ活性を利用する場合は主として数個のdCが付加されるので、3'末端にdGを付加したアダプタープライマーが好ましく用いられ得る。ハイブリダイゼーション法による場合、ハイブリダイゼーションは自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 第2版 (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

こうして得られた完全長cDNAの塩基配列は、部分配列と同様に自体公知の方法 (マキサム・ギルバート法、ジデオキシターミネーション法等) を用いて決定することができる。

配列番号: 1で表される塩基配列を有する、マウス SST20-14(Long form) 蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst20-14(Long form))、および配列番号: 3で表される塩基配列を有する、マウス SST20-14(Short form)蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst20-14(Short form))は、例えば、高脂肪食負荷されたマウス白色脂肪組織由来のcDNAライブラリーから、上記 SST法を用いて得られ、大腸菌 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (20-14)株にクローニングされた核酸 (mSst20-14(partial))の塩基配列 (配列番号: 23)を基に設計したプライマーと、アダプタープライマーとを用いた5'-および3'-RACE反応により得ることができる。

配列番号: 5で表される塩基配列を有する、マウス SST22-22(Long form)蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst22-22(Long form))、および配列番号: 7で表される塩基配列を有する、マウス SST22-22(Short form)蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst22-22(Short form))は、例えば、高脂肪食負荷されたマウス白色脂肪組織由来のcDNAライブラリーから、上記 SST法を用いて得られ、大腸菌 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (22-22)株にクローニングされた核酸 (mSst22-22(partial))の塩基配列

(配列番号：24)を基に設計したプライマーと、アダプタープライマーとを用いた5' - および3' - RACE反応により得ることができる。

- 配列番号：9で表される塩基配列を有する、マウス SST8-5 蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst8-5) は、例えば、高脂肪食負荷されたマウス
- 5 白色脂肪組織由来のcDNAライブラリーから、上記SST法を用いて得られ、大腸菌 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (8-5) 株にクローニングされた核酸 (mSst8-5(partial)) の塩基配列 (配列番号：25) を基に設計したプライマーと、アダプタープライマーとを用いた5' - および3' - RACE反応により得ることができる。
- 10 配列番号：11で表される塩基配列を有する、マウス SST19-15 (Long form) 蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst19-15 (Long form))、および配列番号：13で表される塩基配列を有する、マウス SST19-15 (Short form) 蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst19-15 (Short form)) は、例えば、高脂肪食負荷されたマウス白色脂肪組織由来のcDNAライブラリー
- 15 から、上記SST法を用いて得られ、大腸菌 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (19-15) 株にクローニングされた核酸 (mSst19-15(partial)) の塩基配列 (配列番号：26) を基に設計したプライマーと、アダプタープライマーとを用いた5' - および3' - RACE反応により得ることができる。
- 20 配列番号：15で表される塩基配列を有する、マウス SST13-11 蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst13-11) は、例えば、高脂肪食負荷されたマウス白色脂肪組織由来のcDNAライブラリーから、上記SST法を用いて得られ、大腸菌 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (13-11) 株にクローニングされた核酸 (mSst13-11(partial)) の塩基配列 (配列番号：27)
- 25 を基に設計したプライマーと、アダプタープライマーとを用いた5' - および3' - RACE反応により得ることができる。
- 配列番号：17で表される塩基配列を有する、マウス SST9-8 蛋白質の完全長をコードするDNA (mSst9-8) は、例えば、高脂肪食負荷されたマウス白色脂肪組織由来のcDNAライブラリーから、上記SST法を用いて得

られ、大腸菌 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (9-8) 株にクローニングされた核酸 (mSst9-8(partial)) の塩基配列 (配列番号: 28) を基に設計したプライマーと、アダプタープライマーとを用いた 5' - および 3' - RACE 反応により得ることができる。

- 5 配列番号: 19 で表される塩基配列を有する、マウス SST21-3 蛋白質の完全長をコードする DNA (mSst21-3) は、例えば、高脂肪食負荷されたマウス白色脂肪組織由来の cDNA ライブラリーから、上記 SST 法を用いて得られ、大腸菌 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (21-3) 株にクローニングされた核酸 (mSst21-3(partial)) の塩基配列 (配列番号: 29) を基に  
10 設計したプライマーと、アダプタープライマーとを用いた 5' - および 3' - RACE 反応により得ることができる。

- 配列番号: 21 で表される塩基配列を有する、マウス SST20-6 蛋白質の完全長をコードする DNA (mSst20-6) は、例えば、高脂肪食負荷されたマウス白色脂肪組織由来の cDNA ライブラリーから、上記 SST 法を用いて得られ、大腸菌 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (20-6) 株にクローニングされた核酸 (mSst20-6(partial)) の塩基配列 (配列番号: 30) を基に  
15 設計したプライマーと、アダプタープライマーとを用いた 5' - および 3' - RACE 反応により得ることができる。

- 上記の *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (20-14) 株、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (22-22) 株、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (8-5) 株、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (19-15) 株、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (13-11) 株、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (9-8) 株、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (21-3) 株および *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (20-6) 株は、それぞれ  
20 FERM BP-8104、FERM BP-8109、FERM BP-8110、FERM BP-8108、FERM BP-8107、FERM BP-8105、FERM BP-8102 および FERM BP-8106 の受託番号を付され、平成 14 (2002) 年 7 月 14 日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6) に寄託されている。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAは、上記各配列番号（配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20または22）で表されるアミノ酸配列の一部と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであ  
5 ってもよい。具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（1）上記各配列番号で表される塩基配列の部分塩基配列または（2）上記各配列番号で表される塩基配列を有するDNAとハイストリン  
ジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、前記した本発明の  
10 蛋白質と実質的に同質の活性（例：レセプター（もしくはリガンド）結合活性、シグナル伝達作用など）を有するペプチドをコードするDNAなどが用いられる。

上記各配列番号で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、該塩基配列と  
15 も好ましくは約90%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが挙げられる。ハイストリンジェントな条件としては上記と同様の条件が挙げられる。

クローン化された本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝  
20 酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

上記した本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含

む発現ベクターで宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、本発明の蛋白質（ペプチド）を製造することができる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、該蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片  
5 を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）；枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）；酵母由来プラスミド（例、pSH1  
10 9, pSH15）；昆虫細胞発現プラスミド（例：pFast-Bac）；動物細胞発現プラスミド（例：pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo）； $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ；バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター（例：BmNPV, AcNPV）；レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどの  
15 の動物ウイルスベクターなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、  
20 ーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。  
25

宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、G

APプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライ  
5 シングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点  
(以下、SV40 oriと略称する場合がある)などを含有しているもの  
を用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元  
酵素遺伝子(以下、dhfrと略称する場合がある、メソトレキセート(M  
TX)耐性)、アンピシリン耐性遺伝子(以下、amp<sup>r</sup>と略称する場合が  
10 ある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、  
G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハ  
ムスター細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、  
チミジンを含まない培地によって目的遺伝子を選択することもできる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードする塩基配列  
15 (シグナルコドン)を、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードす  
るDNAの5'末端側に付加(またはネイティブなシグナルコドンと置換)  
してもよい。例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグ  
ナル配列、OmpA・シグナル配列などが;宿主がバチルス属菌である場合、  
 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが;宿主  
20 が酵母である場合、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など  
が;宿主が動物細胞である場合、インスリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インター  
フェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられ  
る。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細  
25 胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ(Escherichia  
coli) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデ  
ミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA), 60巻, 160(1968)], エシェリヒア・コリJM103



〔ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research) , 9 巻, 309 (1981)〕, エシェリヒア・コリ J A 221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology) , 120 巻, 517 (1978)〕, エシェリヒア・コリ HB101 [ジャーナル・オブ・  
5 モレキュラー・バイオロジー, 41 巻, 459 (1969)〕, エシェリヒア・コリ C600 [ジェネティクス (Genetics) , 39 巻, 440 (1954)〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24 巻, 255 (1983)〕, バチルス・  
10 サブチルス 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) , 95 巻, 87 (1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D,  
15 20B-12、シゾサッカロマイセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが AcNPV の場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell ; Sf 細胞) 、 Trichoplusia  
20 ni の中腸由来の MG1 細胞、 Trichoplusia ni の卵由来の High Five<sup>TM</sup> 細胞、 Mamestra brassicae 由来の細胞、 Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが BmNPV の場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N 細胞 ; BmN 細胞) などが用いられる。該 Sf 細胞としては、例えば、Sf9 細胞 (ATCC CRL1711) 、 Sf21 細胞 (以上、Vaughn,  
25 J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) , 315 巻, 592 (1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル COS-7 細胞、サル Vero 細胞、チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO 細胞と略記) 、 dhfr 遺

伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞と略記）、マウスL細胞、マウスAtT-20細胞、マウスミエローマ細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞などが用いられる。

5 形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、69巻、2110（1972）やジーン（Gene）、17巻、107（1982）などに記載の方法に従って形質転換することができる。

10 バチルス属菌は、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス（Molecular & General Genetics）、168巻、111（1979）などに記載の方法に従って形質転換することができる。

15 酵母は、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology）、194巻、182-187（1991）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、75巻、1929（1978）などに記載の方法に従って形質転換することができる。

20 昆虫細胞および昆虫は、例えば、バイオ／テクノロジー（Bio/Technology）、6巻、47-55（1988）などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル、263-267（1995）（秀潤社発行）、ヴィロロジー（Virology）、52巻、456（1973）に記載の方法に従って形質転換することができる。

25 形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有する

- ことが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、
- 5  例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。

- 宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー（Miller），ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス（Journal of Experiments in Molecular Genetics），431-433，Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル
- 10  アクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

- 15  宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15～約43℃で、約3～約24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

  宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約30～約40℃で、約6～約24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

- 20  宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、バークホルダー（Burkholder）最小培地〔Bostian, K.L.ら，プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），77巻，4505（1980）〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G.A.ら，プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），81巻，5330（1984）〕などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～
- 25  約8である。培養は、通常約20℃～約35℃で、約24～約72時間行なわれる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195 巻, 788 (1962)] に非働化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は、好ましくは約 6.2 ~ 約 6.4 である。培養は、通常約 27℃ で、約 3 ~ 約 5 日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約 5 ~ 約 20% の胎児ウシ血清を含む最小必須培地 (MEM) [サイエンス (Science), 122 巻, 501 (1952)], ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) [ヴィロロジー (Virology), 8 巻, 396 (1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199 巻, 519 (1967)], 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。培地の pH は、好ましくは約 6 ~ 約 8 である。培養は、通常約 30℃ ~ 約 40℃ で、約 15 ~ 約 60 時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外に本発明の蛋白質 (ペプチド) を製造せしめることができる。

前記形質転換体を培養して得られる培養物から本発明の蛋白質 (ペプチド) を自体公知の方法に従って分離精製することができる。

例えば、本発明の蛋白質 (ペプチド) を培養菌体あるいは細胞の細胞質から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過により可溶性蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100<sup>TM</sup> などの界面活性剤を含んでいてもよい。一方、膜面分から本発明の蛋白質 (ペプチド) を抽出する場合は、

上記と同様に菌体あるいは細胞を破壊した後、低速遠心で細胞デブリスを沈澱除去し、上清を高速遠心して細胞膜含有画分を沈澱させる（必要に応じて密度勾配遠心などにより細胞膜画分を精製する）などの方法が用いられる。

また、本発明の蛋白質（ペプチド）が菌体（細胞）外に分泌される場合には、  
5 培養物から遠心分離またはろ過等により培養上清を分取するなどの方法が用いられる。

このようにして得られた可溶性画分、膜画分あるいは培養上清中に含まれる本発明の蛋白質（ペプチド）の単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアク  
10 リルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの  
15 等電点の差を利用する方法；などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

かくして得られる蛋白質（ペプチド）が遊離体である場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって、該遊離体を塩に変換することができ、蛋白質またはペプチドが塩として得られた場合には、自体公知の方法  
20 あるいはそれに準じる方法により、該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、形質転換体が産生する本発明の蛋白質（ペプチド）を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。該蛋白修飾酵素として  
25 には、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして得られる本発明の蛋白質（ペプチド）の存在は、それに対する特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

さらに、本発明の蛋白質（ペプチド）は、上記の本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAに対応するRNAを鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞蛋白質翻訳系を用いてインビトロ合成することができる。あるいは、さらにRNAポリメラーゼを含む無細胞転写／翻訳系を用いて、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを鋳型としても合成することができる。

「本発明の蛋白質（即ち、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20または22で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質）をコードする塩基配列またはその一部」、あるいは「該塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部」を含有する核酸とは、前述の本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードする核酸だけではなく、フレームの合わない塩基配列をも含む意味で用いられる。

目的核酸の標的領域と相補的な塩基配列を含む核酸、即ち、目的核酸とハイブリダイズすることができる核酸は、該目的核酸に対して「アンチセンス」であるということができる。一方、目的核酸の標的領域と相同性を有する塩基配列を含む核酸は、該目的核酸に対して「センス」であるということができる。ここで「相同性を有する」または「相補的である」とは、塩基配列間で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性または相補性を有することをいう。

本発明の蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸（以下、「本発明のアンチセンス核酸」ともいう）は、クローン化した、あるいは決定された本発明の蛋白質をコードする核酸の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした核酸は、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の複製または発現を阻害することができる。即ち、本発明のアンチセンス核酸は、本発明の蛋白質をコードする遺伝子から転写されるRNAとハイブリダイズすることができ、mRNAの合成（プロセッシング）または機能（蛋白質への翻訳）を阻害することができる。

本発明のアンチセンス核酸の標的領域は、アンチセンス核酸がハイブリダ

イズすることにより、結果として本発明の蛋白質の翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、該蛋白質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAまたは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性  
5 性の問題を考慮すれば、約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいがそれに限定されない。具体的には、例えば、本発明の蛋白質をコードする核酸の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および  
10 3'端ヘアピンループが標的領域として選択しうるが、本発明の蛋白質をコードする遺伝子内の如何なる領域も標的として選択しうる。例えば、該遺伝子のイントロン部分を標的領域とすることもまた好ましい。

さらに、本発明のアンチセンス核酸は、本発明の蛋白質をコードするmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズして蛋白質への翻訳を阻害する  
15 だけでなく、二本鎖DNAである本発明の蛋白質をコードする遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAの転写を阻害し得るものであってもよい。

アンチセンス核酸は、2-デオキシ-D-リボースを含有しているデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチド  
20 を含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天  
25

- 然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- アンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。
- すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992;



Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

- アンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与
- 5    されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。
- 10    付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、
- 15    エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。
- 20    本発明の蛋白質をコードするmRNAもしくは初期転写産物を、コード領域の内部（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）で特異的に切断し得るリボザイムもまた、本発明のアンチセンス核酸に包含され得る。「リボザイム」とは核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、最近では当該酵素活性部位の塩基配列を有するオリゴDNAも同様に核酸切断活性を有
- 25    することが明らかになっているので、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵

素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを

5 攻撃することがないというさらなる利点を有する。SS169 mRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザイムを、それをコード

10 するDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

本発明の蛋白質をコードするmRNAもしくは初期転写産物のコード領域

15 内の部分配列（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相補的な二本鎖オリゴRNA（siRNA）もまた、本発明のアンチセンス核酸に包含され得る。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAに相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉（RNAi）と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、最近、この現象が哺乳動物

20 細胞でも起こることが確認されたことから [Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として注目されている。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムは、本発明の蛋白質をコードするcDNA配列もしくはゲノムDNA配列情報に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的領域を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、

25 これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。RNAi活性を有するsiRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中で、例えば、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8

時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらを実行アニーリングさせた後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い二本鎖ポリヌクレオチドを調製することもできる。

- 5      本発明のアンチセンス核酸の遺伝子発現阻害活性は、本発明の蛋白質をコードする核酸を含有する形質転換体、生体内や生体外の本発明の蛋白質をコードする遺伝子発現系または本発明の蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。
- 10      本発明はまた、本発明の蛋白質（ペプチド）に対する抗体を提供する。該抗体は、本発明の蛋白質（ペプチド）に対して特異的親和性を有するものであれば、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。本発明の蛋白質（ペプチド）に対する抗体は、該蛋白質（ペプチド）を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。
- 15      できる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 20      本発明の蛋白質（ペプチド）は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 25      モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された哺乳動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化

SS169 類と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256 巻、495 頁 (1975 年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、

5 ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG が用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0 などが挙げられるが、P3U1 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1 : 1 ~ 20 : 1 程度であり、

10 PEG (好ましくは、PEG1000 ~ PEG6000) が 10 ~ 80 % 程度の濃度で添加され、約 20 ~ 40℃、好ましくは約 30 ~ 37℃ で約 1 ~ 10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着

15 させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテイン A を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテイン A を吸着させた固相にハイブリ

20 リドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常は HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および

25 育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1 ~ 20 %、好ましくは 10 ~ 20 % の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1 ~ 10 % の牛胎児血清を含む GIT 培地 (和光純薬工業 (株)) またはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、

通常 20～40℃、好ましくは約 37℃である。培養時間は、通常 5 日～3 週間、好ましくは 1 週間～2 週間である。培養は、通常 5 % 炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

5 (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテイン A あるいはプロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（蛋白質等の抗原）とキャリアー蛋白質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の蛋白質（ペプチド）に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1～20、好ましくは約 1～5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、哺乳動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

前記の方法によりクローニングされ、配列決定された本発明の蛋白質をコードするcDNAに対応する遺伝子の発現局在性（例：白色脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓、骨格筋など）や所定のストレス（例：高脂肪食負荷、絶食、絶食後再給餌、インスリン抵抗性惹起因子刺激など）条件下における発現変動は、クローニングされたcDNAをそのまま、もしくは決定された塩基配列に基づいて該cDNAの一部を合成したものをプローブとして、種々の組織由来のRNAについて、あるいはストレス条件下および非ストレス条件下における所定の組織由来のRNAについてノーザンブロット分析を行うか、合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして定量的RT-PCRを実施することにより同定することができる。

本発明の蛋白質をコードする遺伝子は、いずれも高脂肪食負荷された白色脂肪組織で高発現している。このうち Sst20-14 遺伝子は白色脂肪組織特異的な発現を示すが、Sst19-15、Sst13-11、Sst9-8 および Sst21-3 遺伝子は褐色脂肪組織でも発現している。Sst21-3 遺伝子は未分化な前駆脂肪細胞でも発現している。

Sst20-14 遺伝子は絶食時に発現が低下し、絶食後再給餌により発現が上昇（回復）する。さらに、該遺伝子はTNF- $\alpha$ などのインスリン抵抗性惹起因子の刺激に応答して発現が低下する。また、該遺伝子の過剰発現により、

前駆脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化が抑制される。

Sst18-5 遺伝子はインスリン抵抗性改善薬の刺激に応答して発現が上昇する。

5 Sst13-11 遺伝子は絶食時に発現が低下し、絶食後再給餌により発現が上昇（回復）する。また、該遺伝子は高脂肪－高スクロース負荷に応答して発現が上昇する。さらに、該遺伝子は肥満モデルにおいて高発現している。

Sst21-3 遺伝子は絶食時に発現が低下し、絶食後再給餌により発現が上昇（回復）する。また、該遺伝子は糖尿病モデルにおいて高発現している。

Sst19-15 遺伝子もまた絶食時に発現が低下し、絶食後再給餌により発現が上昇（回復）する。

10 上記の通り、本発明の蛋白質をコードする遺伝子は、食事やインスリン抵抗性調節薬の刺激に応答して、あるいは肥満や糖尿病の病態において発現が変動し、また、その発現の変動により脂肪細胞の分化に影響を及ぼす。

したがって、本発明の蛋白質（ペプチド）、該蛋白質（ペプチド）をコードする核酸（アンチセンス核酸を含む）、および該蛋白質（ペプチド）に対する抗体は、（1）本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物（本発明の蛋白質が膜蛋白質の場合はそれに対するリガンド、分泌蛋白質の場合はそれに対するレセプター）の決定、（2）本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤、（3）本発明の蛋白質の過剰発現に関連する疾患の予防・治療剤、（4）遺伝子診断剤、（5）本発明の蛋白質の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、（6）本発明の蛋白質の発現量を変化させる化合物を含有する各種疾患の予防・治療剤、（7）本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物の定量法、（8）本発明の蛋白質とそれに対して特異的親和性を有する化合物との結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、（9）本発明の蛋白質とそれに対して特異的親和性を有する化合物との結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾患の予防・治療剤、（10）本発明の蛋白質（ペプチド）の定量、（11）細胞膜または細胞外液における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニング方法、（12）細胞膜または細胞外液における本発明の蛋白質の量を変化さ

せる化合物を含有する各種疾患の予防・治療剤、（１３）本発明の蛋白質（ペプチド）をコードするDNAを有する非ヒトトランスジェニック動物の作製、（１４）本発明の蛋白質をコードする遺伝子が不活性化されたノックアウト非ヒト動物の作製などに用いることができる。

- 5       特に、本発明の組換え蛋白質（ペプチド）の発現系を用いたアフィニティーアッセイ系を使用することによって、本発明の蛋白質とそのレセプター（もしくはリガンド）の結合性を変化させる化合物（例：アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾患の予防・治療剤などとして使用することができる。

- 10       本発明の蛋白質（ペプチド）、該蛋白質（ペプチド）をコードするDNA（以下、「本発明のDNA」と略記する場合がある）、本発明のアンチセンス核酸および本発明の蛋白質（ペプチド）に対する抗体（以下、「本発明の抗体」と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

（１）本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物の決定

- 15       本発明の蛋白質（ペプチド）は、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物（レセプターもしくはリガンド）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

- すなわち、本発明は、本発明の蛋白質（ペプチド）と試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法を提供する。
- 20

- 試験化合物としては、本発明の蛋白質が膜レセプターである場合、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブインテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチ
- 25



ン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$  および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなど)の他に、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター

5 蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。一方、本発明の蛋白質が分泌蛋白質である場合、試験化合物として、例えば上記リガンドに対する公知のレセプターの他に、上記と同様にヒトまたは哺乳動物の組織抽出物、無傷細胞、細胞膜画分、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、無傷細胞、細胞膜

10 画分、細胞培養上清などを本発明の分泌蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のレセプター等を得ることができる。

具体的には、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法は、本発明の蛋白質(ペプチド)を用いるか、または組換えによる該蛋白質(ペプチド)の発現系を構築し、該発現系を用いたアフィニティーアッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物(例

20 えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)、または本発明の分泌蛋白質に結合して上記の細胞刺激活性を有する化合物、あるいはそれらの塩を決定する方法である。

本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法においては、本発明の蛋白質(ペプチド)と試験化合物とを接触させた

場合の、例えば、該蛋白質（ペプチド）に対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- ①標識した試験化合物を、本発明の蛋白質（ペプチド）に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質（ペプチド）に対する結合量を測定  
5 することを特徴とする、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法、
- ②標識した試験化合物を、本発明の蛋白質を産生する細胞または細胞膜画分、あるいは細胞外液または細胞培養上清（この場合、例えば、上記の本発明の  
10 抗体を固定化した固相（細胞培養プレート等）を用いて分泌蛋白質を固相化する）に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞、該膜画分、該細胞外液または該細胞培養上清に対する結合量を測定することを特徴とする、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法、
- ③標識した試験化合物を、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコード  
15 するDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した、または培養上清に分泌された本発明の蛋白質（ペプチド）（この場合、例えば、上記の本発明の抗体を固定化した固相（細胞培養プレート等）を用いて分泌蛋白質（ペプチド）を固相化する）に接触させた場合における、標  
20 識した試験化合物の該蛋白質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法、
- ④試験化合物（または試験化合物である膜蛋白質等を細胞膜上に含有する細胞）を、本発明の膜蛋白質を産生する細胞（または本発明の分泌蛋白質を生  
25 成する細胞の培養上清）に接触させた場合における、本発明の膜蛋白質（または試験化合物である膜蛋白質等）を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性また

は抑制する活性など)を測定することを特徴とする本発明の膜蛋白質(または分泌蛋白質)またはその塩に対するリガンド(またはレセプター)の決定方法、および

- ⑤試験化合物(または試験化合物である膜蛋白質等を細胞膜上に含有する細胞)を、本発明の膜蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該膜蛋白質(または本発明の分泌蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって培養上清中に分泌された該分泌蛋白質)に接触させた場合における、本発明の膜蛋白質(または試験化合物である膜蛋白質等)を介する細胞刺激活性(例えば、
- 5 アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とする本発明の膜蛋白質(または分泌蛋白質)またはその塩に対するリガンド(またはレセプター)
- 10 一)の決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明の蛋白質(ペプチド)に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

- まず、リガンド(またはレセプター)決定方法に用いる本発明の蛋白質
- 20 (ペプチド)としては、上記した本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた本発明の組換え蛋白質などが適している。

- 本発明の組換え蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、本発明の蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現させる
- 25 ことにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、cDNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物(または昆虫)細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を、SV40由来のプロモ

ーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、S R  $\alpha$  プロモーター、昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現した蛋白質の量と質の検査は  
5 それ自体公知の方法で行なうことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

10 本発明のリガンド (またはレセプター) 決定方法において、本発明の蛋白質 (ペプチド) は、それ自体公知の方法に従って精製した本発明の蛋白質 (ペプチド) であってもよいし、本発明の蛋白質 (ペプチド) を産生する細胞またはその細胞膜画分、あるいは本発明の蛋白質 (ペプチド) を分泌する細胞の培養上清の形態で用いてもよい。

15 本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質 (ペプチド) を産生する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質 (ペプチド) を含有する細胞とは、本発明の蛋白質 (ペプチド) を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、  
20 酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

前記細胞膜画分とは、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダー  
25 やポリトロン (Kinematica 社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm~3,000 rpm) で短時間 (通常、約1~10分)

遠心し、上清をさらに高速（15,000rpm～30,000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の蛋白質（ペプチド）と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 5      本発明の蛋白質（ペプチド）を産生する細胞やその膜画分中の本発明の蛋白質（ペプチド）の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのがより好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定  
10      できるようになる。

本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の①～③の方法を実施するためには、適当な本発明の蛋白質（ペプチド）含有膜画分と標識した試験化合物が必要である。

- 本発明の蛋白質（ペプチド）含有膜画分としては、天然型の本発明の蛋白質含有膜画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型の本発明の蛋白質（ペプチド）含有膜画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等  
15      のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

- 標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシ  
20      ストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ  
インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、  
25      ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、 $\text{GRO}\alpha$ 、 $\text{GRO}\beta$ 、 $\text{GRO}\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、M

CP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどが好適である。

- 5        具体的には、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明の蛋白質（ペプチド）を産生する細胞またはその膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することにより本発明の蛋白質（ペプチド）標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの本発明の
- 10      蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解
- 15      を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10ml本発明の蛋白質（ペプチド）懸濁液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知る
- 20      ために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0～50℃、望ましくは約4～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは $\gamma$ -カウンターで計測する。全結合量
- 25      （B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越える試験化合物を本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の④～⑤の方法を実施するためには、本発明の蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、

アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の蛋白質（ペプチド）を産生する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法について、本発明の蛋白質が膜蛋白質の場合を取り上げて具体的に説明したが、当業者は、上記の手法を応用して、本発明の蛋白質が分泌蛋白質の場合についても容易に特異的親和性を有する化合物の決定を実施することができるだろう。

本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定用キットは、本発明の蛋白質（ペプチド）、本発明の蛋白質を産生する細胞またはその膜画分、本発明の蛋白質を分泌する細胞の培養上清などを含有するものである。

本発明のリガンド（レセプター）決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド（レセプター）決定用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径  $0.45\ \mu\text{m}$  のフィルターで濾過滅菌し、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

## ②本発明の蛋白質（ペプチド）標品

5 本発明の蛋白質（ペプチド）を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに  $5 \times 10^5$  個／穴で継代し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $95\% \text{air}$  で2日間培養したもの（本発明の蛋白質が分泌蛋白質の場合、該プレートは該蛋白質に対する抗体でコーティングされている）。

## ③標識試験化合物

10 市販の  $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  など標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの。

水溶液の状態のものを  $4^{\circ}\text{C}$  あるいは  $-20^{\circ}\text{C}$  にて保存し、用時に測定用緩衝液にて  $1\ \mu\text{M}$  に希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

## ④非標識試験化合物

15 標識化合物と同じものを  $100 \sim 1,000$  倍濃い濃度に調製する。

## 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質（ペプチド）発現CHO細胞を、測定用緩衝液  $1\ \text{ml}$  で2回洗浄した後（本発明の蛋白質が分泌される場合は、細胞および培養上清を除去後プレートを測定用緩衝液で同様に洗浄した後）、 $490\ \mu\text{l}$  の測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を  $5\ \mu\text{l}$  加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を  $5\ \mu\text{l}$  加えておく。

③反応液を除去し、 $1\ \text{ml}$  の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞（プレート）に結合した標識試験化合物を  $0.2\ \text{N NaOH} - 1\% \text{SDS}$  で溶解し、  
25  $4\ \text{ml}$  の液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明の膜蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具



体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、  
5 CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーン リレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが用いられる。また、本発明の分泌蛋白質またはその塩に結合することが  
10 できるレセプターとしては、上記したリガンドに対するレセプターや種々のオーファンレセプターなどが用いられる。

（2）本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤

上記（1）において、本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物が明らかになれば、該化合物が有する作用に応じて、①本発明の蛋白質  
20 （ペプチド）または②該蛋白質（ペプチド）をコードするDNAを、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明の蛋白質が減少しているためにリガンド  
25 （またはレセプター）の生理作用が期待できない（本発明の蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明の蛋白質（ペプチド）を該患者に投与し本発明の蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明の蛋白質（ペプチド）をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明の蛋白質（ペプチド）をコードするDNAを導入し

発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における本発明の蛋白質の量を増加させ、リガンド（またはレセプター）の作用を十分に発揮させることができる。即ち、本発明の蛋白質（ペプチド）またはそれをコードするDNAは、安全で低毒性な、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤として有用である。

本発明の蛋白質は、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現し、さらに食事、インスリン抵抗性調節薬による刺激、肥満・糖尿病などの病態に応じて発現が変動し、その発現の変動が脂肪細胞の分化に影響することなどから、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患としては、脂肪細胞の分化および／または代謝機能（特に糖・脂質代謝）の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）などが挙げられる。

①本発明の蛋白質（ペプチド）および②該蛋白質（ペプチド）をコードするDNA（本明細書中、「本発明のDNA」と称する場合もある）は、必要に応じて薬理的に許容し得る担体とともに混合して医薬組成物とした後に、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤として用いることができる。

ここで、薬理的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

賦形剤の好適な例としては、乳糖、白糖、D-マンニトール、D-ソルビトール、デンプン、 $\alpha$ 化デンプン、デキストリン、結晶セルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アラビアゴム、デキストリン、プルラン、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどが挙げられる。

滑沢剤の好適な例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。

結合剤の好適な例としては、 $\alpha$ 化デンプン、ショ糖、ゼラチン、アラビア  
ゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチル  
セルロースナトリウム、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、トレハ  
ロース、デキストリン、プルラン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロ  
キシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

崩壊剤の好適な例としては、乳糖、白糖、デンプン、カルボキシメチルセ  
ルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナ  
トリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、軽質無水ケイ酸、低置換  
度ヒドロキシプロピルセルロースなどが挙げられる。

10 溶剤の好適な例としては、注射用水、生理的食塩水、リンゲル液、アルコ  
ール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ゴマ油、トウモロ  
コシ油、オリーブ油、綿実油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレング  
リコール、D-マンニトール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール  
15 ル、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナ  
トリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムな  
どが挙げられる。

懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリ  
ル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザル  
20 コニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活  
性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメ  
チルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロー  
ス、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親  
水性高分子；ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが挙  
25 げられる。

等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニ  
トール、D-ソルビトール、ブドウ糖などが挙げられる。

緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩など  
の緩衝液などが挙げられる。

無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコールなどが挙げられる。

防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

- 5 抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸塩などが挙げられる。

- 着色剤の好適な例としては、水溶性食用タール色素（例、食用赤色2号および3号、食用黄色4号および5号、食用青色1号および2号などの食用色素、水不溶性レーキ色素（例、前記水溶性食用タール色素のアルミニウム塩など）、天然色素（例、β-カロチン、クロロフィル、ベンガラなど）などが挙げられる。
- 10

甘味剤の好適な例としては、サッカリンナトリウム、グリチルリチン酸二カリウム、アスパルテーム、ステビアなどが挙げられる。

- 前記医薬組成物の剤形としては、例えば錠剤、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、顆粒剤、散剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などの経口剤；および注射剤（例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤など）、外用剤（例、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤など）、坐剤（例、直腸坐剤、膣坐剤など）、ペレット、点滴剤、徐放性製剤（例、徐放性マイクロカプセルなど）等の非経口剤が挙げられる。
- 15

- 20 医薬組成物は、製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方に記載の方法等により製造することができる。以下に、製剤の具体的な製造法について詳述する。医薬組成物中の有効成分の含量は、剤形、有効成分の投与量などにより異なるが、例えば約0.1ないし100重量%である。

- 例えば、経口剤は、有効成分に、賦形剤（例、乳糖、白糖、デンプン、D-マンニトールなど）、崩壊剤（例、カルボキシメチルセルロースカルシウムなど）、結合剤（例、α化デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなど）または滑沢剤（例、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール6000など）などを添加して圧縮成形し、次いで必要により、味のマ
- 25

スキング、腸溶性あるいは持続性を目的として、コーティング基剤を用いて自体公知の方法でコーティングすることにより製造される。

該コーティング基剤としては、例えば糖衣基剤、水溶性フィルムコーティング基剤、腸溶性フィルムコーティング基剤、徐放性フィルムコーティング基剤などが挙げられる。

糖衣基剤としては、白糖が用いられ、さらに、タルク、沈降炭酸カルシウム、ゼラチン、アラビアゴム、プルラン、カルナバロウなどから選ばれる1種または2種以上を併用してもよい。

水溶性フィルムコーティング基剤としては、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロースなどのセルロース系高分子；ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、アミノアルキルメタアクリレートコポリマーE〔オイドラギットE（商品名）、ロームファルマ社〕、ポリビニルピロリドンなどの合成高分子；プルランなどの多糖類などが挙げられる。

腸溶性フィルムコーティング基剤としては、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース フタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロース アセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、酢酸フタル酸セルロースなどのセルロース系高分子；メタアクリル酸コポリマーL〔オイドラギットL（商品名）、ロームファルマ社〕、メタアクリル酸コポリマーLD〔オイドラギットLD-30D55（商品名）、ロームファルマ社〕、メタアクリル酸コポリマーS〔オイドラギットS（商品名）、ロームファルマ社〕などのアクリル酸系高分子；セラックなどの天然物などが挙げられる。

徐放性フィルムコーティング基剤としては、例えばエチルセルロースなどのセルロース系高分子；アミノアルキルメタアクリレートコポリマーRS〔オイドラギットRS（商品名）、ロームファルマ社〕、アクリル酸エチル・メタアクリル酸メチル共重合体懸濁液〔オイドラギットNE（商品名）、ロームファルマ社〕などのアクリル酸系高分子などが挙げられる。

上記したコーティング基剤は、その2種以上を適宜の割合で混合して用い

てもよい。また、コーティングの際に、例えば酸化チタン、三二酸化鉄等のような遮光剤を用いてもよい。

注射剤は、有効成分を分散剤（例、ポリソルベート 80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 など、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど）、保存剤（例、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノールなど）、等張化剤（例、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖など）などと共に水性溶剤（例、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液等）あるいは油性溶剤（例、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油などの植物油、プロピレングリコール等）などに溶解、懸濁あるいは乳化することにより製造される。この際、所望により溶解補助剤（例、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、安定剤（例、ヒト血清アルブミン等）、無痛化剤（例、ベンジルアルコール等）等の添加物を用いてもよい。注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの適当な発現ベクター中に挿入した後、常套手段に従って投与することもできる。また、本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

本発明の蛋白質（ペプチド）の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、

通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

### （3）本発明の蛋白質の過剰発現に関連する疾患の予防・治療剤

本発明の蛋白質（ペプチド）に対する抗体は、本発明の蛋白質の関与するシグナル伝達機能、例えば、本発明の蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化（すなわち中和）することができる。一方、本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドのアンチセンス核酸（リボザイムやRNAi活性を有する二本鎖オリゴRNAを含む）は、本発明の蛋白質遺伝子の転写、転写産物のプロセッシングおよび／またはmRNAからの翻訳をブロックすることにより、本発明の蛋白質の発現を阻害することができる。従って、①本発明の抗体または②本発明のアンチセンス核酸を、本発明の蛋白質の過剰発現に関連する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

本発明の蛋白質は、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現し、さらに食事、インスリン抵抗性調節薬による刺激、肥満・糖尿病などの病態に応じて発現が変動し、その発現の変動が脂肪細胞の分化に影響することなどから、本発明の蛋白質の過剰発現に関連する疾患としては、脂肪細胞の分化および／または代謝機能（特に糖・脂質代謝）の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）などが挙げられる。

本発明の抗体および本発明のアンチセンス核酸は、前記「本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤」と同様にして製剤化することができる。また、該アンチセンス核酸は、そのまま、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

本発明の抗体の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のアンチセンス核酸の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、よ



り好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

#### (4) 遺伝子診断剤

- 5       本発明の蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸（以下、「本発明のセンス核酸」という）または本発明のアンチセンス核酸は、プローブとして使用することにより、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明の蛋白質をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出すること  
10       ができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

- 本発明のセンス核酸またはアンチセンス核酸を用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法  
15       （ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

- 20       例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明の蛋白質の発現低下が検出された場合は、例えば、該蛋白質の機能不全に関連する疾患に罹患している、もしくは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また逆に、例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明の蛋白質の発現過多が検出された場合は、例えば、該蛋白質の機能亢進に関連する疾患  
25       に罹患している、もしくは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

      本発明の蛋白質は、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現し、さらに食事、インスリン抵抗性調節薬による刺激、肥満・糖尿病などの病態に応じて発現が変動し、その発現の変動が脂肪細胞の分化に影響することな

どから、本発明のセンス核酸またはアンチセンス核酸は、脂肪細胞の分化および／または代謝機能（特に糖・脂質代謝）の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）の診断に有用である。

5      (5) 本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のセンスまたはアンチセンス核酸は、プローブとして用いることにより、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。また、本発明のセンス核酸およびアンチセンス核酸を一对のプライマーとして用い、R T - P C Rを行うことによ

10      っても、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等

15      に含まれる本発明の蛋白質（ペプチド）をコードするmRNA量を測定することによる、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明の蛋白質（ペプチド）をコードするmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

20      (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には、肥満マウス、糖尿病マウス、高血圧ラット、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧薬、血管作用薬、抗癌剤など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは

25      特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織（例えば、褐色または白色脂肪組織など）、あるいは細胞（脂肪細胞など）を得る。

得られた細胞に含まれる本発明の蛋白質をコードするmRNAは、例えば、

通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えばTaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノーザンブロットを行なうことにより解析することもできる。

- (ii) 本発明の蛋白質（ペプチド）を発現する形質転換体を前述の方法に従って作製し、該形質転換体に含まれる本発明の蛋白質（ペプチド）をコードするmRNAを同様にして定量、解析することができる。

本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、細胞に含まれる本発明の蛋白質をコードするmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後）、該形質転換体に含まれる本発明の蛋白質（ペプチド）をコードするmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

- 本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物のスクリーニング用キットは、(a) 本発明のセンスおよび／またはアンチセンス核酸、好ましくは二本鎖オリゴDNAからなるプローブ、または(b) 本発明のセンス核酸および本発明のアンチセンス核酸からなるプライマーセットを構成として含むことを特徴とする。該プローブとしては、常法によりRI、蛍光または酵素等で標識されたものが使用される。

該スクリーニング用キットは、所望により、さらにRNA抽出用試薬およ

び／またはツール（例：抽出バッファー、スピнкаラム等）、PCRまたはノーザンハイブリダイゼーション用試薬および／またはツール（例：dNTPs、PCR反応バッファー、耐熱性DNAポリメラーゼ等）、本発明の蛋白質（ペプチド）を発現する形質転換体などを含んでいてもよい。

- 5      本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）本発明の蛋白質の発現量を増加させることにより、本発明の蛋白質とそのレセプター（またはリガンド）との相互作用を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞
- 10    内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、（ロ）本発明の蛋白質の発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。
- 15    該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明の蛋白質の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 20    該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明の蛋白質の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬として使用する場合、前記「本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤」と同様にして製剤化することができる。

- 25    このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝

- 異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例
- 5 えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。
- 10 （6）本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物を含有する各種疾患の予防・治療剤
- 本発明の蛋白質は、前述の通り、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現し、さらに食事、インスリン抵抗性調節薬による刺激、肥満・糖尿病などの病態に応じて発現が変動し、その発現の変動が脂肪細胞の分化に影響することなどから、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明の蛋白質をコードする
- 15 遺伝子の発現量を変化させる化合物は、脂肪細胞の分化および／または代謝機能（特に糖・脂質代謝）の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）の
- 20 予防・治療剤として用いることができる。
- 該化合物を本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する疾患の予防・治療剤として使用する場合は、前記「本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤」と同様にして製剤化することができる。
- このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動
- 25 物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。
- 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100

mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき

5 約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

（7）本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物（リガンドまたは

10 レセプター）の定量法

本発明の蛋白質（ペプチド）は、本発明の蛋白質に対するリガンド（またはレセプター）に対して結合性を有しているので、生体内における該リガンド（またはレセプター）濃度を感度良く定量することができる。

本発明のリガンド（またはレセプター）定量法は、例えば、競合法と組み

15 合わせて実施することができる。すなわち、被検体を本発明の蛋白質（ペプチド）と接触させることによって被検体中のリガンド（またはレセプター）濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って実施することができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

20 ②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

（8）本発明の蛋白質とそれに対して特異的親和性を有する化合物（リガンドまたはレセプター）との結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法

本発明の蛋白質（ペプチド）を用いるか、または本発明の組換え蛋白質

25 （ペプチド）の発現系を構築し、該発現系を用いたアフィニティーアッセイ系を使用することによって、本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）の結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する  
5 活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の膜蛋白質もしくは本発明の分泌蛋白質のレセプターに対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の膜蛋白質もしくは本発明の分泌蛋白質のレセプターに対するアンタゴニスト）、（ハ）本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合力を増強する化合物、  
10 あるいは（ニ）本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、上記（１）で述べたリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（i）本発明の蛋白質（ペプチド）とそのリガンド  
15 （またはレセプター）とを接触させた場合と（ii）本発明の蛋白質（ペプチド）とそのリガンド（またはレセプター）および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

20 本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、本発明の蛋白質に対するリガンド（またはレセプター）の結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンド（またはレセプター）を、本発明の蛋白質（ペプチド）  
25 に接触させた場合と、標識したリガンド（またはレセプター）および試験化合物を本発明の蛋白質（ペプチド）に接触させた場合における、標識したリガンド（またはレセプター）の該蛋白質（ペプチド）に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- ②標識したリガンド（またはレセプター）を、本発明の蛋白質を産生する細胞またはその膜画分、あるいは細胞外液または細胞培養上清（この場合、例えば、上記の本発明の抗体を固定化した固相（細胞培養プレート等）を用いて本発明の蛋白質を固相化する）に接触させた場合と、標識したリガンド
- 5 （またはレセプター）および試験化合物を本発明の蛋白質を産生する細胞またはその膜画分、あるいは細胞外液または細胞培養上清に接触させた場合における、標識したリガンド（またはレセプター）の該細胞または膜画分、あるいは細胞外液または細胞培養上清に対する結合量を測定し、比較すること
- 10 を特徴とする本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ③標識したリガンド（またはレセプター）を、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質（ペプチド）、または培養上清に分泌された本発明の蛋白質（ペプチド）（この場合、例えば、上記の本発明の抗体を固定化した固相（細胞培養プレート等）
- 15 を用いて本発明の蛋白質（ペプチド）を固相化する）に接触させた場合と、標識したリガンド（またはレセプター）および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質（ペプチド）、または培養上清に分泌された本発明の蛋白質（ペプチド）に接触させた場合における、標識したリガンド（またはレセプター）の
- 20 該蛋白質（ペプチド）に対する結合量を測定し、比較すること
- を特徴とする本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ④本発明の蛋白質を活性化する化合物（例えば、本発明の膜蛋白質等に対するリガンドなど）または本発明の蛋白質により活性化される化合物（例えば、
- 25 本発明の分泌蛋白質に対するレセプターなど）を、本発明の蛋白質を細胞膜上に発現する細胞または本発明の蛋白質が分泌された培養上清に接触させた場合と、本発明の蛋白質を活性化する化合物または本発明の蛋白質により活性化される化合物および試験化合物を、本発明の蛋白質を細胞膜上に発現する細胞または本発明の蛋白質が分泌された培養上清に接触させた場合におけ



- る、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- ⑤本発明の蛋白質を活性化する化合物（例えば、本発明の膜蛋白質に対するリガンドなど）または本発明の蛋白質により活性化される化合物（例えば、本発明の分泌蛋白質に対するレセプターなど）を、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質（ペプチド）または本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって培養上清中に分泌された本発明の蛋白質（ペプチド）に接触させた場合と、本発明の蛋白質を活性化する化合物または本発明の蛋白質により活性化される化合物および試験化合物を、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質（ペプチド）または本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって培養上清中に分泌された本発明の蛋白質（ペプチド）に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の蛋白質（ペプチド）としては、上記した本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明の蛋白質を産

生する哺乳動物の臓器の細胞膜画分または細胞外液が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来の本発明の蛋白質（ペプチド）などが適している。

- 5       本発明の蛋白質（ペプチド）を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現させることにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片にはcDNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA断片を宿主動物（昆虫）細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス
- 10       (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現した蛋白質の量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行なうことができる。
- 15
- 20

したがって、本発明のスクリーニング方法において用いられる本発明の蛋白質（ペプチド）は、それ自体公知の方法に従って精製した本発明の蛋白質（ペプチド）であってもよいし、本発明の蛋白質（ペプチド）を産生する細胞またはその細胞膜画分、あるいは本発明の蛋白質（ペプチド）を分泌する

25       細胞の培養上清の形態であってもよい。

上記スクリーニング方法において、本発明の蛋白質（ペプチド）を産生する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質（ペプチド）を産生する細胞としては、本発明の蛋白質（ペプチド）を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

前記細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、  
5 Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica 社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破  
10 碎液を低速（500rpm～3,000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15,000rpm～30,000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の蛋白質（ペプチド）と細胞由来のリン脂質や膜蛋  
15 白質などの膜成分が多く含まれる。

本発明の蛋白質（ペプチド）を産生する細胞やその膜画分中の本発明の蛋白質（ペプチド）の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのがより好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリー  
20 ニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当な本発明の蛋白質（ペプチド）含有画分と、標識したリガンドが必要である。

25 本発明の蛋白質含有画分としては、天然型の本発明の蛋白質含有画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型の本発明の蛋白質含有画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナロ

グ化合物などが用いられる。例えば  $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などで標識されたりガンドなどが用いられる。

具体的には、本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明の蛋白質（ペプチド）を産生  
5 する細胞またはその膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明の蛋白質（ペプチド）標品を調製する。バッファーには、 $\text{pH} 4 \sim 10$ （望ましくは  $\text{pH} 6 \sim 8$ ）のリン酸バッファー、トリス-塩酸  
10 バッファーなどの本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、  
プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテ  
15 アーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5,000cpm~50,000cpm）の標識したりガンドを添加し、同時に $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。  
非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から  
20 37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-  
カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ $B_0$ ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50%以下になる試験化合物  
25 を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の④~⑤の方法を実施するためには、例えば、本発明の蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトール

リン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明の蛋白質（ペプチド）を産生する細胞をマルチ  
5 ウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞  
10 が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、本発明の蛋白質  
15 （ペプチド）を膜上に発現した適当な細胞が必要である。本発明の蛋白質（ペプチド）を発現した細胞としては、天然型の本発明の膜蛋白質を産生する細胞株、前述の本発明の組換え蛋白質（ペプチド）を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、  
20 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法について、本発明の蛋白質が  
25 膜蛋白質である場合を取り上げて具体的に説明したが、本発明の蛋白質が分泌蛋白質である場合も、当業者は、上記の手法を応用して、本発明の分泌蛋白質とそのレセプターの結合性を変化させる化合物を容易にスクリーニングすることができる。

本発明の蛋白質とそれに対して特異的親和性を有する化合物（リガンドま

たはレセプター)の結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質(ペプチド)、本発明の蛋白質(ペプチド)を産生する細胞またはその膜画分、あるいは本発明の蛋白質(ペプチド)を分泌する細胞の培養上清などを含有するものである。

- 5 本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。

- 10 孔径0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②本発明の蛋白質(ペプチド)標品

- 15 本発明の蛋白質(ペプチド)を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの(本発明の蛋白質(ペプチド)が分泌される場合、該プレートは該蛋白質に対する抗体でコーティングされている)。

③標識リガンド(レセプター)

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したリガンド(レセプター)

- 20 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu\text{M}$ に希釈する。

④リガンド(レセプター)標準液

リガンド(レセプター)を0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

- 25 標識レセプターおよびレセプター標準液としては、レセプター蛋白質を適当な脂質組成からなるリポソーム膜に包埋させたプロテオリポソームを適当な分散媒(水、PBS等)中に懸濁し、4℃で保存したものを用いることもできる。

2. 測定法

- ① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質（ペプチド）発現 CHO細胞を、測定用緩衝液 1 ml で2回洗浄した後（本発明の蛋白質（ペプチド）が分泌される場合は、細胞および培養上清を除去後プレートを測定用緩衝液で同様に洗浄した後）、490  $\mu$  l の測定用緩衝液を各穴に加える。
- 5 ②  $10^{-3} \sim 10^{-10}$  M の試験化合物溶液を 5  $\mu$  l 加えた後、標識リガンド（またはレセプター）を 5  $\mu$  l 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに  $10^{-3}$  M のリガンド（またはレセプター）標準液を 5  $\mu$  l 加えておく。
- 10 ③反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞（またはプレート）に結合した標識リガンド（またはレセプター）を 0.2 N NaOH-1% SDS で溶解し、4 ml の液体シンチレーター A（和光純薬製）と混合する。
- ④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。
- 15 〔数1〕
- $$\text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$
- PMB : Percent Maximum Binding
- B : 検体を加えた時の値
- NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)
- 20  $B_0$  : 最大結合量
- 上記スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明の蛋白質とそれに対して特異的親和性を有する化合物（リガンドまたはレセプター）との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）リガンドーレセプター相互作用を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の膜蛋白質または本発明の分泌蛋白質のレセプターに対
- 25

するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明の膜蛋白質または本発明の分泌蛋白質のレセプターに対するアンタゴニスト)、(ハ)本発明の蛋白質とそのリガンド(またはレセプター)との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ)本発明の蛋白質とそのリガンド(またはレセプター)との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明の膜蛋白質(もしくは本発明の分泌蛋白質のレセプター)に対するアゴニストは、本発明の膜蛋白質に対するリガンド(もしくはレセプターに対する本発明の分泌蛋白質)が有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の膜蛋白質(もしくは本発明の分泌蛋白質のレセプター)に対するアンタゴニストは、本発明の膜蛋白質に対するリガンド(もしくはレセプターに対する本発明の分泌蛋白質)が有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の膜蛋白質とそのリガンド(もしくは本発明の分泌蛋白質とそのレセプター)との結合力を増強する化合物は、本発明の膜蛋白質に対するリガンド(もしくはレセプターに対する本発明の分泌蛋白質)が有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の膜蛋白質とそのリガンド(もしくは本発明の分泌蛋白質とそのレセプター)との結合力を減少させる化合物は、本発明の膜蛋白質に対するリガンド(もしくはレセプターに対する本発明の分泌蛋白質)が有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

上記スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を医薬として使用する場合、前記「本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤」と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動



物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

（9）本発明の蛋白質とそれに対して特異的親和性を有する化合物（リガンドまたはレセプター）との結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾患の予防・治療剤

本発明の蛋白質は、前述の通り、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現し、さらに食事、インスリン抵抗性調節薬による刺激、肥満・糖尿病などの病態に応じて発現が変動し、その発現の変動が脂肪細胞の分化に影響することなどから、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明の蛋白質とそのリガンド（もしくはレセプター）との結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）は、脂肪細胞の分化および／または代謝機能（特に糖・脂質代謝）の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）の予防・治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、前記「本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤」と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動

物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

#### （10）本発明の蛋白質（ペプチド）の定量

本発明の抗体は、本発明の蛋白質（ペプチド）を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の蛋白質（ペプチド）の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（i）本発明の抗体と、被検液および標識した本発明の蛋白質（ペプチド）とを競合的に反応させ、該抗体に結合した該標識化蛋白質（ペプチド）の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質（ペプチド）の定量法、

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質（ペプチド）の定量法を提供する。

上記（ii）においては、不溶化抗体と標識化抗体とが互いに本発明の蛋白質（ペプチド）との結合を妨害しないような抗原認識部位を有することが好ましい（例えば、一方の抗体が本発明の蛋白質（ペプチド）の N 端部を認識し、他方の抗体が本発明の蛋白質（ペプチド）の C 端部に反応する等）。

本発明の蛋白質（ペプチド）に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質（ペプチド）の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の F (a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいは F a b 画分を用いてもよい。本発明の蛋白質（ペプチド）に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明の蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ －ガラクトシダーゼ、 $\beta$ －グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体

を反応させ（２次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができ

5

る。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

10

本発明のサンドイッチ法による本発明の蛋白質（ペプチド）の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は本発明の蛋白質（ペプチド）の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質（ペプチド）のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

15

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

20

25

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、い

ずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフ

5   ロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の蛋白質（ペプチド）の定量に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の蛋白質（ペプチド）の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技

10   術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵  
15   素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「メソッズ・イン・エンジモロジー（Methods in ENZYMOLOGY）」 Vol. 70

（Immunochemical Techniques (Part A)）、同書 Vol. 73（Immunochemical Techniques (Part B)）、同書 Vol. 74（Immunochemical Techniques (Part C)）、同書 Vol. 84（Immunochemical Techniques (Part D: Selected  
20   Immunoassays)）、同書 Vol. 92（Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)）、同書 Vol. 121（Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)）（以上、アカデミックプレス社発行）など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明の蛋白質（ペ  
25   プチド）を高感度に定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明の蛋白質またはその塩を定量することによって、本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する各種疾患の診断をすることができる。本発明の蛋白質は、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現し、さらに食事、インスリン抵抗性調節薬

による刺激、肥満・糖尿病などの病態に応じて発現が変動し、その発現の変動が脂肪細胞の分化に影響することなどから、本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する疾患としては、脂肪細胞の分化および／または代謝機能（特に糖・脂質代謝）の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）などが挙げられる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の蛋白質またはその塩を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質（ペプチド）を精製するために使用する抗体カラムの作製、  
10 精製時の各分画中の本発明の蛋白質（ペプチド）の検出、被検細胞内における本発明の蛋白質の挙動の分析などに使用することができる。

（１１）細胞膜または細胞外における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明の蛋白質（ペプチド）を特異的に認識することができるので、細胞膜または細胞外における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

（i）非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明の蛋白質を定量することによる、細胞膜における本発明の膜蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニング方法（あるいは、非ヒト哺乳動物の血漿、尿、その他の体液等の細胞外液を分離し、それに含まれる本発明の蛋白質を定量することによる、細胞外における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニング方法）、

25 （ii）本発明の蛋白質（ペプチド）を発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明の蛋白質（ペプチド）を定量することによる、細胞膜における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニング方法（あるいは、本発明の蛋白質（ペプチド）を発現する形質転換体の培養上清を分離し、該培養上清に含まれる本発明の蛋白質

(ペプチド)を定量することによる、細胞外における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニング方法)、

(iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層  
5 での本発明の蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の本発明の蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(iv) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での本発明の蛋白質  
10 (ペプチド)の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の本発明の蛋白質(ペプチド)を確認することによる、細胞膜における本発明の蛋白質(ペプチド)の量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明の蛋白質(ペプチド)の定量は具体的には以下のようにして行なう。

15 (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には、肥満マウス、糖尿病マウス、高血圧ラット、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧剤、血管作用薬、抗癌剤など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは  
20 特定の臓器(例えば、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉など)、組織(例えば、褐色または白色脂肪組織など)あるいは細胞(例えば、脂肪細胞、筋肉細胞など)を得る。得られた細胞等を、例えば、適当な緩衝液(例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、H E P E S緩衝液など)等に懸濁し、界面活性剤  
25 (例えば、トリトンX 1 0 0™、ツイーン2 0™など)などを用いて該細胞等を破壊し、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分とは、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-

Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica 社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3,000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15,000rpm～30,000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、本発明の蛋白質（ペプチド）と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明の蛋白質（ペプチド）は、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は前述の方法と同様に行なうことができる。ウエスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

（ii）本発明の蛋白質（ペプチド）を発現する形質転換体を前述の方法に従って作製し、細胞膜画分に含まれる本発明の蛋白質（ペプチド）を定量することができる。

細胞膜における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニングは、

（i）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、細胞膜における本発明の蛋白質の量を定量することにより行なうことができ、



(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後）、細胞膜における本発明の蛋白質（ペプチド）の量を定量することにより行なうことができる。

- 5 細胞膜画分に含まれる本発明の蛋白質（ペプチド）の確認は、具体的には以下のようにして行なう。

- (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には、肥満マウス、糖尿病マウス、高血圧ラット、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧剤、血管作用薬、抗癌剤など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、肝臓、腎臓など）、組織（例えば、褐色または白色脂肪組織など）あるいは細胞（例えば、脂肪細胞など）を得る。得られた細胞等
- 10 等を、常法に従って組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での本発明の蛋白質の染色度合いを定量化することによって、細胞膜上の本発明の蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明の蛋白質（ペプチド）の量を確認することができる。

- (iv) 本発明の蛋白質（ペプチド）を発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。
- 20

- 細胞膜における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニング用キットは、本発明の抗体を構成として含むことを特徴とする。本発明の抗体は、用いる免疫学的測定方法に応じて、上記（10）で述べたいずれかの形態で供することができる。例えば、サンドウィッチ法を用いる場合には、
- 25 1次反応に用いる本発明の抗体は適当な不溶性担体（例：アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等）に固定化された（もしくはされ得る）状態で、2次反応に用いられる本発明の抗体は適当な標識剤
- [例：放射性同位元素（ $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ など）、

- 酵素（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、蛍光物質（フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど）、発光物質（ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）等]で標識された
- 5 （もしくははされ得る）状態で提供される。

該スクリーニング用キットは、所望により、さらに免疫学的測定に必要もしくは好適なブロッキング試薬、洗浄液などや、細胞膜画分の単離に必要もしくは好適な試薬類、本発明の蛋白質（ペプチド）を発現する形質転換体などを含んでいてもよい。

- 10 上記スクリーニング方法およびスクリーニング用キットについて、本発明の蛋白質が膜蛋白質である場合の、細胞膜における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニングを取り上げて具体的に説明したが、当業者は、上記の手法を応用して、本発明の蛋白質が分泌蛋白質である場合の、細胞外における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物のスクリーニングにつ
- 15 いても容易に実施し得ることはいうまでもない。

- 上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明の膜蛋白質の量、あるいは細胞外における本発明の分泌蛋白質の量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）細胞膜における本発明の膜蛋白質、あるいは細胞外における本発明の分泌蛋白質の
- 20 量を増加させることにより、リガンド-レセプター相互作用を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、
- 25 （ロ）細胞膜における本発明の膜蛋白質、あるいは細胞外における本発明の分泌蛋白質の量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、

公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明の蛋白質の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

5 該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明の蛋白質の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬として使用する場合、前記「本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤」と同様にして製剤化することができる。

10 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100  
15 mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ま  
20 しくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

（12）細胞膜あるいは細胞外における本発明の蛋白質の量を変化させる化合物を含有する各種疾患の予防・治療剤

25 本発明の蛋白質は、前述の通り、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現し、さらに食事、インスリン抵抗性調節薬による刺激、肥満・糖尿病などの病態に応じて発現が変動し、その発現の変動が脂肪細胞の分化に影響することなどから、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。従って、細胞膜あるいは細胞外におけ

る本発明の蛋白質の量を変化させる化合物は、脂肪細胞の分化および／または代謝機能（特に糖・脂質代謝）の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）の予防・治療剤として用いることができる。

- 5     該化合物を本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する疾患の予防・治療剤として使用する場合は、前記「本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤」と同様にして製剤化することができる。

          このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg
- 15     である。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト
- 20     以外の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

（13）本発明の蛋白質をコードするDNAを有する非ヒトトランスジェニック動物の作製

- 本発明は、外来性の本発明の蛋白質をコードするDNA（以下、本発明の
- 25     外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 〔1〕本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、  
〔2〕ゲッ歯動物である第〔1〕記載の動物、

〔３〕ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第〔２〕記載の動物、および  
〔４〕本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に８細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠失、他の

塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明の蛋白質等を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明の蛋白質の機能を抑制する蛋白質等を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のDNAを担持させる発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニーマウス白血病ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラストラーゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、

グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ $\beta$ Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明の蛋白質等の翻訳領域は、各種哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムD

NAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常な本発明の蛋白質等の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異させた翻訳領域を作製することによって得ることができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流（および所望により転写終結部位の上流）に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

10 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

20 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

25 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。



本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を増強することにより最終的に本発明の蛋白質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能亢進症や、該蛋白質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の蛋白質の増加症状を有することから、該蛋白質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明の蛋白質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症における本発明の異常蛋白質による正常蛋白質の機能阻害（dominant negative 作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明  
5 の異常蛋白質の増加症状を有することから、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- 10 ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現された蛋白質を分析することによる、本発明の蛋白質により特異的に発現あるいは活性化する蛋白質等との関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用しての、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- 15 ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の変異蛋白質の単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性  
20 型不応症などを含む、該蛋白質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明の蛋白質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシ  
25 ンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明の蛋白質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることもでき、本発明の蛋白質およびその作用解明のための有効な研究材料とな

る。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症を含む、該蛋白質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明の蛋白質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(14) 本発明の蛋白質をコードする遺伝子が不活性化されたノックアウト非ヒト動物の作製

10 本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

〔1〕 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

15 〔2〕 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第〔1〕項記載の胚幹細胞、

〔3〕 ネオマイシン耐性である第〔1〕項記載の胚幹細胞、

〔4〕 ゲッ歯動物である第〔1〕項記載の胚幹細胞、

〔5〕 ゲッ歯動物がマウスである第〔4〕項記載の胚幹細胞、

20 〔6〕 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、  
〔7〕 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、

〔8〕 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、

25 〔9〕 ゲッ歯動物がマウスである第〔8〕項記載の非ヒト哺乳動物、および  
〔10〕 第〔7〕項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明の蛋白質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明の蛋白質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、poly A付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別する

ことにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は

正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

- 5       このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-10000\text{ U/ml}$ ）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃
- 10       で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的
- 15       に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

- ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー (J. Embryol. Exp. Morphol.)、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のE
- 20       S細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明の蛋白質または該蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。
- 25

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と

区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入されたターゲッティングベクター中の本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。哺乳動物における組換えの多くは非相同的であるため、相同組換えを起こした細胞をスクリーニングする手段として、例えば、本発明のDNAの内部にネオマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子を挿入するとともに、本発明のDNAの近傍にチミジンキナーゼ（tk）遺伝子を含むターゲッティングベクターを構築して胚幹細胞または卵細胞に導入し、挿入された薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子であればG418等）およびガンシクロビル存在下で生存する細胞を選択する方法が挙げられる。即ち、相同組換えにより本発明の挿入変異DNAが染色体上に組み込まれた場合、tk遺伝子は排除されるのでガンシクロビル耐性であるが、非相同組換えで組み込まれた場合はtk遺伝子も同時に組み込まれるためガンシクロビル感受性となる。また、tk遺伝子の代わりにジフテリア毒素遺伝子などを用いれば、ランダム挿入された細胞は該毒素の産生により死滅するので、単一の薬剤での選択が可能となる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞の最終的な確認は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析を用いて行なうことができる。

非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時

期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

- 5     該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常ヘテロ発現不全個体であるので、  
10    当該ヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明の蛋白質のホモ発現不全個体を得ることができる。

- 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これら  
15    のトランスジェニック非ヒト哺乳動物から、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

      このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- 20    さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘ  
25    テロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

      本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

      また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明の蛋白質により



誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、該蛋白質の生物活性の不活性化を原因とする疾患のモデルとなり得るので、これらの疾患の原因究明及び治療法の検討に有用である。

- (1 4 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾患に対して治療・  
5 予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾患に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾患に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。  
10

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 15 試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾患の症状など  
20 の変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択す

- 25 ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・

予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明の蛋白質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患、例えば、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患（例：肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記「本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤」と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）にお

いては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

- 5 (14b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現するものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

- 20 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明の蛋白質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明の蛋白質の発現する組織で、該蛋白質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド(X-gal)のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明の蛋白質の動物生体内

における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明の蛋白質を欠損するマウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1 mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明の蛋白質の発現を促進し、該蛋白質の機能を促進することができるので、例えば、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患などの予防・治療薬などの医薬として有用である。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明の蛋白質の発現を阻害し、該蛋白質の機能を阻害することができるので、例えば、該蛋白質の発現過多に関連する疾患などの予防・治療薬などの医薬として有用である。

本発明の蛋白質の機能不全もしくは発現過多に関連する疾患としては、例えば、脂肪細胞の分化および/または代謝機能の異常が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）等が

挙げられる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、  
5 前記した本発明の蛋白質とそのリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

10 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20  
15 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば糖・脂質代謝異常患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することが  
20 できる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する  
25 各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明の蛋白質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々の蛋白質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、

特異的にその蛋白質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明の蛋白質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

5 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ  
10 L体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
15	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
20	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
25	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン

	I l e	: イソロイシン
	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
5	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
10	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
15	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
20	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で

表記

25 する。

T o s	: p-トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
B z l	: ベンジル
C l <sub>2</sub> Bz l	: 2, 6-ジクロロベンジル

	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
5	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェノール
	T r t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
10	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミ ド

15 D C C : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-14 (Long form) をコードする cDNA の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：2〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-14 (Long form) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

25 マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-14 (Short form) をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-14 (Short form) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕



マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST22-22 (Long form) をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

- 5    マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST22-22 (Long form) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST22-22 (Short form) をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

- 10    マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST22-22 (Short form) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST8-5 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

- 15    〔配列番号：10〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST8-5 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

- 20    マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST19-15 (Long form) をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST19-15 (Long form) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：13〕

- 25    マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST19-15 (Short form) をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST19-15 (Short form) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST13-11 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

- 5      マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST13-11 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST9-8 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

- 10     〔配列番号：18〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST9-8 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：19〕

- 15     マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST21-3 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST21-3 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：21〕

- 20     マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-6 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-6 のアミノ酸配列を示す。

- 25     〔配列番号：23〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片 mSst20-14(partial) の塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片 mSst22-

22 (partial) の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片 mSst18-5 (partial) の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：26〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片 mSst19-15 (partial) の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片 mSst13-10 11 (partial) の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片 mSst9-8 (partial) の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

15 マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片 mSst21-3 (partial) の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片 mSst20-6 (partial) の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：31〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片を増幅するためのプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片を増幅するためのプライマーの塩基配列を示す。

25 〔配列番号：33〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-14 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-14 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

5     〔配列番号：35〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST22-22 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

10     マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST22-22 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

15     マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST8-5 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

20     マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST8-5 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST19-15 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

25     〔配列番号：40〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST19-15 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST13-11 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

- 5      マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST13-11 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

- 10      マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST9-8 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

- 15      マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST9-8 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

- 20      マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST21-3 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

- 20      マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST21-3 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

- 25      マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-6 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

マウス白色脂肪組織由来分泌もしくは膜蛋白質 mSST20-6 の全長をコード

する塩基配列を同定するための 3'-RACE 用遺伝子特異的プライマーの塩基配列を示す。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、  
5 モレキュラー・クローニング (Molecular cloning; 上述) に記載されている方法に従った。

#### 実施例 1

マウス白色脂肪組織由来の分泌・膜蛋白質 cDNA のスクリーニング

10 マウスプロ B 細胞株 Ba/F 3 (理研セルバンク ; RCB0805) は、その生存・増殖に IL-3 が必須である。該細胞は細胞膜上にトロンボポイエチン受容体 (MPL) を発現しており、リガンドであるトロンボポイエチンの結合によりホモ二量体を形成し、細胞内に増殖シグナルが伝えられる。MPL は、膜貫通領域の Ser<sup>498</sup>Asn 変異によりリガンド非依存的な恒常的活性型 (MPL<sup>M</sup>) になり、Ba/F 3 が IL-3 非存在下においてもその生存・増殖が維持され、しかも、MPL<sup>M</sup>の活性には細胞外ドメインの大半は不要で、C末端の 187 アミノ酸を含めば細胞膜上に発現してホモ二量体を形成し得ることが見出されている (Kojima および Kitamura, 上述)。すな  
15 わち、細胞外領域を欠失させた MPL<sup>M</sup>の 5' 側に cDNA を組み込めるようデザインされたレトロウイルスベクターを作製し、組み込んだ cDNA がシグナルシーケンスを有していれば、cDNA にコードされた蛋白質と MPL<sup>M</sup>の融合蛋白質が Ba/F 3 の細胞膜上に発現し、該 Ba/F 3 が IL-3 非依存下で生存・増殖することになる。この原理に基づいて、Met<sup>1</sup>~Thr<sup>441</sup>を欠失させた MPL<sup>M</sup>のコード領域 ( $\Delta$ MPL<sup>M</sup>) を含むレトロ  
20 ウイルスベクター (pMX-SST ; Kojima および Kitamura, 上述) の BstXI サイトに、高脂肪食負荷マウス白色脂肪組織由来 cDNA を挿入してレトロウイルス発現ライブラリーを構築し、分泌・膜蛋白質 cDNA のクローニングを行った。

まず、高脂肪食負荷マウス (C57Bl/6J, 12 週齢, オスに 12 日間 30%高脂

肪食を与えた) から内臓脂肪組織(腸間膜および副睾丸周囲の白色脂肪)を切除し、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いて、添付のプロトコールに従って poly A(+) RNA を単離し、SuperScript Choice System (Gibco-BRL) を用いてランダムヘキサマーにより cDNA に変換した。

- 5 得られた cDNA を、BstXI アダプター (Invitrogen) を用いてレトロウイルスベクター pMX-SST の BstXI サイトに挿入し、MPL<sup>M</sup> の 5' 側に該 cDNA をライゲーションさせた。得られた DNA を E. coli DH10B 株にエレクトロポレーション法を用いて導入し、増幅させた。常法に従ってプラスミド DNA を精製し、
- 10 7(12): 1063-1066, 2000; 東京大学 医科学研究所 北村俊雄博士より入手) (2 x 10<sup>6</sup> 細胞/dish) に Lipofectamine<sup>TM</sup> 試薬 (Invitrogen) を用いて添付のプロトコールに従いトランスフェクションした。10% ウシ胎仔血清添加 DMEM 培地中で 24 時間培養後に、同新鮮培地に交換し 24 時間培養し培養上清を採取して感染性を有した高力価レトロウイルスストック (感染効率
- 15 10-30%) を得た。このレトロウイルスストックで蛋白質発現用細胞 (Ba/F3) を感染させ、IL-3 添加 RPMI1640 培地中で 1 日間培養した後、96-well プレート中に 1 x 10<sup>4</sup>/well となるように播き、IL-3 無添加培地中で選択した。感染後に増殖性を保持した Ba/F3 を選択し、それらから常法によりゲノム DNA を抽出した。次いで、配列番号 31 および 32 に示されるオリゴヌクレオチドをプライマーとし、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行
- 20 った (98℃、60 秒の後、98℃、20 秒および 68℃、120 秒を 30 サイクル)。増幅された断片を pENTR/D-topo (Invitrogen, 登録商標) にサブクローニングした。各 cDNA インサートの塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Kit (PE Biosystems) および DNA 自動シーケンサー
- 25 (ABI Prism 377) を用いて決定したところ、8 つの新規な cDNA クローン (Sst20-6、Sst22-22、Sst9-8、Sst13-11、Sst19-15、Sst20-14、Sst21-3 および Sst8-5) が確認された。

尚、上記 8 種の cDNA クローンをそれぞれ挿入されたプラスミド pENTR/D-TOPO (20-6)、pENTR/D-TOPO (22-22)、pENTR/D-TOPO (9-8)、pENTR/D-

TOPO (13-11)、pENTR/D-TOPO (19-15)、pENTR/D-TOPO (20-14)、pENTR/D-TOPO (21-3)およびpENTR/D-TOPO (8-5)で大腸菌コンピテントセル Escherichia coli Top10 (Invitrogen) を形質転換し、形質転換体 Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (20-6)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (22-22)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (9-8)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (13-11)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (19-15)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (20-14)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (21-3)およびEscherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (8-5)株を得た。これらの大腸菌株は、それぞれ FERM BP-8106、FERM BP-8109、FERM BP-8105、FERM BP-8107、FERM BP-8108、FERM BP-8104、FERM BP-8102 および FERM BP-8110 の受託番号を付され、平成14年7月2日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第6）に寄託されている。

15

## 実施例 2

### 新規分泌・膜蛋白質遺伝子の発現解析

実施例1で得られた新規 cDNA をプローブとして用い、種々の条件下でノーザンブロット解析によりこれらの遺伝子の発現の様子を調べた。

20 まず、白色脂肪組織における発現と、発現組織の特異性を解析した。その結果、Sst20-14 は白色脂肪組織特異的な発現を示した。一方、Sst21-3, Sst13-11, Sst9-8, Sst19-15 は褐色脂肪組織においても発現が確認された。

Sst13-11 は、高脂肪-高スクロース負荷マウスにおいて、対照マウスと比較して発現量が上昇した。また、肥満モデルマウス ob/ob においても、対照  
25 の C57b16/J マウスと比較して発現量が上昇した。

Sst21-3 は、糖尿病モデルマウス db/db において、対照の C57b16/J マウスと比較して発現量が上昇した。また、白色脂肪に分化しうる 3T3-L1 細胞における発現を調べたところ、Sst21-3 は未分化な前駆脂肪細胞でも発現していた。



Sst20-14 は、得られたクローン断片中に、リポ蛋白質の脂質に結合しうるモチーフを有していた。

さらに、Sst20-14、Sst19-15、Sst13-11、Sst21-3 は、絶食により発現量が低下し、絶食後再給餌により発現量が上昇（回復）した。

5

### 実施例 3

#### 完全長 cDNA のクローニング

実施例 1 で得られた 8 つの新規分泌もしくは膜蛋白質の cDNA 断片について、決定された各々の塩基配列を基に 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマー  
10 (GSP1) および 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマー (GSP2) (Sst20-14 についてはそれぞれ配列番号 33 および 34 ; Sst22-22 についてはそれぞれ配列番号 35 および 36 ; Sst18-5 についてはそれぞれ配列番号 37 および 38 ; Sst19-15 についてはそれぞれ配列番号 39 および 40 ; Sst13-11 についてはそれぞれ配列番号 41 および 42 ; Sst9-8 についてはそれぞれ配列番号 43 および 44 ; Sst21-3 についてはそれぞれ配列番号 45 および 46 ; Sst20-6 についてはそれぞれ配列番号 47 および 48) を設計し、SMART™  
RACE cDNA amplification kit (clontech) を用いて 5' -RACE および 3' -RACE 反応を実施した。実験は kit の添付書に従って実施した。C57BL/6J マウスから実施例 1 と同様にして全 RNA を抽出した後、アダプタープライマー  
20 の附加と逆転写反応を行って cDNA を作製した。この cDNA を鋳型として PCR を以下の条件で行った (94℃ 5sec, 72℃ 3min=5cycle, 94℃ 5sec, 69℃ 10sec, 72℃ 3min=5cycle, 94℃ 5sec, 66℃ 10sec, 72℃ 3min=40cycle)。PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動で分離し、得られたバンドをゲルから切り出して抽出した後、pCR4-TOPO または pENTR/D-TOPO (いずれも  
25 Invitrogen) 中に TA クローニングした。得られたプラスミドのインサート DNA の配列を常法により決定したところ、いずれのクローンも完全な ORF を含んでいた。また、Sst20-14、Sst22-22 および Sst19-15 については長さの異なる ORF を含む 2 種類のクローンが得られた (ORF の長短によりそれぞれ Long form およ Short form と命名した)。これら合計 11 種の cDNA クローン

がそれぞれ挿入されたプラスミド pCR4-TOPO(SST20-14long form)、pCR4-TOPO(SST20-14short form)、pCR4-TOPO(SST22-22long form)、pCR4-TOPO(SST22-22short form)、pCR4-TOPO(SST8-5)、pCR4-TOPO(SST19-15long form)、pCR4-TOPO(SST19-15short form)、pCR4-TOPO(SST13-11)、pENTR/D-TOPO(SST9-8)、pCR4-TOPO(SST21-3) および pCR4-TOPO(SST20-6) で大腸菌コンピテントセル *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) を形質転換し、形質転換体(1) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST20-14long form)、(2) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST20-14short form)、(3) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST22-22long form)、(4) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST22-22short form)、(5) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST8-5)、(6) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST19-15long form)、(7) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST19-15short form)、(8) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST13-11)、(9) *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO(SST9-8)、(10) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST21-3) および(11) *Escherichia coli* Top10/pCR4-TOPO(SST20-6) 株を得た。これらの大腸菌株は、それぞれ FERM BP-8406、FERM BP-8407、FERM BP-8408、FERM BP-8409、FERM BP-8402、FERM BP-8404、FERM BP-8405、FERM BP-8403、FERM BP-8411、FERM BP-8413 および FERM BP-8412 の受託番号を付され、(1)～(8)については平成15(2003)年6月20日付で、(9)～(11)については平成15(2003)年6月24日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に寄託されている。

#### 実施例 4

##### 25 前脂肪細胞株 3T3-L1 の成熟脂肪細胞への分化に対する作用解析

3T3-L1 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well の細胞数で 6-well plate に播種し、10%ウシ胎仔血清(Invitrogen)添加 DMEM(invitrogen)培地中、37℃下で7日間培養後、培養液を吸引し PBS(Invitrogen)で2回洗浄後、OPTI-MEM(Invitrogen)を 2ml/well 添加した。OPTI-MEM(100  $\mu$ l)および FuGENE™6(10  $\mu$ l、Roche)を

混合し室温にて 5 分間静置したものに、発現プラスミドである pCMV-Tag4A (Sigma) の EcoRI-HindIII クローニングサイトに SST20-14 (Long form) cDNA を挿入して作製した発現用コンストラクト pCMV-SST20-14 を 2  $\mu$ g 添加し、室温にて 45 分間静置した。該発現コンストラクト含有溶液を上記の

5 3T3-L1 細胞に添加し、37℃で 6 時間培養した後、10%ウシ胎仔血清添加 DMEM 培地中、37℃下で 40 時間培養した。次いで、分化培地 [250nM デキサメタゾン (Sigma)、0.5mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン (和光純薬)、10  $\mu$ g/ml インスリン (Sigma)、10%ウシ胎仔血清添加 DMEM 培地] に交換して 72 時間培養した。その後、10%ウシ胎仔血清添加 DMEM 培地中でさらに 8 日間培

10 養した。培養終了後、培養液を吸引し、PBS で 2 回洗浄し、10%ホルマリン (和光純薬) を 2ml 加えて 30 分間静置した。蒸留水で 2 回洗浄後、oil red-O 溶液を添加し 10 分間染色し、蒸留水で 2 回洗浄後、風乾し脂肪滴の蓄積を調べた。その結果、SST20-14 を過剰発現させた 3T3-L1 細胞は、対照コントロール 3T3-L1 細胞に比較して、脂肪滴の蓄積が顕微鏡下による観察で定性的に半分以下に減少し、成熟脂肪細胞への分化に影響を与えた。

15

#### 実施例 5

##### 新規分泌・膜蛋白質遺伝子のインスリン抵抗性惹起因子による発現解析

3T3-L1 細胞を 4x10<sup>5</sup>cells/well の細胞数で 6-well plate に播種し、10%ウシ胎仔血清 (Invitrogen) 添加 DMEM (Invitrogen) 培地中、37℃下で 5 日間培養

20 後、分化培地 [250nM デキサメタゾン (Sigma)、0.5mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン (和光純薬)、10  $\mu$ g/ml インスリン (Sigma)、10%ウシ胎仔血清添加 DMEM 培地] に交換し、さらに 24 時間培養した。分化培地への交換の際、TNF- $\alpha$  (Genzyme Techne) をそれぞれ 1nM、100pM および 10pM の濃度で同時に

25 添加した。培養終了後、PBS (Invitrogen) で洗浄した後、細胞を回収した。回収した細胞から総 RNA を RNeasy kit (Qiagen) を用いて、kit 添付の手順書に従って採取した。採取した総 RNA を用いて、SST20-14 および内部標準として用いる 36B4 の mRNA 発現量を TaqMan PCR (Applied Biosystems) を用いて定量した。その結果、添加した TNF- $\alpha$  の濃度に依存して SST20-14 の発現量

が変動し、TNF- $\alpha$ の1nMの24時間添加により、SST20-14の発現量は、コントロール（TNF- $\alpha$ 無添加）に比較して約70%の発現低下が認められた。

#### 実施例6

##### 5 新規分泌・膜蛋白遺伝子のインスリン抵抗性改善薬による発現解析

3T3-L1細胞を $4 \times 10^5$  cells/wellの細胞数で6-well plateに播種し、10%ウシ胎仔血清(Invitrogen)添加DMEM(Invitrogen)培地中、37℃下で5日間培養後、分化培地[250nM デキサメタゾン(Sigma)、0.5mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン(和光純薬)、10 $\mu$ g/ml インスリン(Sigma)、10%ウシ胎仔血清  
10 添加DMEM 培地]に交換した。分化培地への交換の際、インスリン抵抗性改善薬である塩酸ピオグリタゾン(10 $\mu$ M、武田薬品)を添加し、インスリン存在下で72時間培養した。培養終了後、PBS(Invitrogen)で洗浄した後、細胞を回収した。回収した細胞から総RNAをRNAeasy kit(Qiagen)を用いて、kit添付の手順書に従って採取した。採取した総RNAを用いて、SST8-5および内  
15 部標準として用いる36B4のmRNA発現量をTaqMan PCR(Applied Biosystems)を用いて定量した。その結果、塩酸ピオグリタゾンの添加によってSST8-5の発現量がコントロール（塩酸ピオグリタゾン無添加）と比較して約2.4倍に増加した。

##### 20 産業上の利用可能性

本発明の蛋白質は、高脂肪食負荷により白色脂肪細胞で発現する分泌もしくは膜蛋白質であることなどから、脂肪細胞の分化や代謝機能の異常に関連する疾患の予防・治療剤として、あるいは当該疾患の予防・治療に有効な医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして優れた効果を発揮す  
25 る。

#### 配列表フリーテキスト

〔配列番号：31〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質cDNA断片を増幅するた

めのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：32〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA 断片を増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

5 〔配列番号：33〕

mSST20-14 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：34〕

10 mSST20-14 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：35〕

mSST22-22 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：36〕

15 mSST22-22 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：37〕

mSST8-5 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

20 〔配列番号：38〕

mSST8-5 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：39〕

25 mSST19-15 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：40〕

mSST19-15 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：41〕

mSST13-11 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：42〕

5 mSST13-11 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：43〕

mSST9-8 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：44〕

10 mSST9-8 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：45〕

mSST21-3 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

15 〔配列番号：46〕

mSST21-3 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：47〕

20 mSST20-6 の全長をコードする塩基配列を同定するための 5' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

〔配列番号：48〕

mSST20-6 の全長をコードする塩基配列を同定するための 3' -RACE 用遺伝子特異的プライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。  
5
2. 請求項1記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。
3. 請求項2記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として  
10 該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。
4. 請求項1記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。  
15
5. 配列番号：4 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。
6. 請求項5記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含む  
20 ポリヌクレオチド。
7. 請求項6記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として  
該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。  
25
8. 請求項5記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
9. 配列番号：6 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の

アミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

10. 請求項9記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

5

11. 請求項10記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

10 12. 請求項9記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

13. 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

15

14. 請求項13記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

20 15. 請求項14記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

16. 請求項13記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

25

17. 配列番号：10で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

18. 請求項17記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドをコードする塩基配列



を含むポリヌクレオチド。

19. 請求項18記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

20. 請求項17記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

21. 配列番号：12で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

22. 請求項21記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

15

23. 請求項22記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

24. 請求項21記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

25. 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

25

26. 請求項25記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

27. 請求項26記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果と

して該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

28. 請求項25記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

29. 配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

30. 請求項29記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

31. 請求項30記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

32. 請求項29記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

33. 配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

34. 請求項33記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

35. 請求項34記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

36. 請求項33記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

37. 配列番号：20で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

38. 請求項37記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

39. 請求項38記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

40. 請求項37記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

41. 配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

42. 請求項41記載の蛋白質もしくは部分ペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

43. 請求項42記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオチド。

44. 請求項41記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

45. 請求項1、5、9、13、17、21、25、29、33、37または41記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

5 46. 請求項2、6、10、14、18、22、26、30、34、38または42記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

47. 請求項3、7、11、15、19、23、27、31、35、39または43記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

10

48. 請求項4、8、12、16、20、24、28、32、36、40または44記載の抗体を含有してなる医薬。

15 49. 脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である請求項45～48のいずれかに記載の医薬。

50. 請求項2、6、10、14、18、22、26、30、34、38もしくは42記載のポリヌクレオチドまたはその一部を含有してなる診断薬。

20 51. 請求項3、7、11、15、19、23、27、31、35、39または43記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。

52. 請求項4、8、12、16、20、24、28、32、36、40または44記載の抗体を含有してなる診断薬。

25

53. 脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の診断用である請求項50～52のいずれかに記載の診断薬。

54. 請求項1、5、9、13、17、21、25、29、33、37また

は 4 1 記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを含む、該蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物またはその塩、あるいは該蛋白質またはその塩と該化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

5

5 5. 請求項 1、5、9、13、17、21、25、29、33、37 または 4 1 記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含んでなる、該蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物またはその塩、あるいは該蛋白質またはその塩と該化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

10

5 6. 請求項 5 4 記載の方法または請求項 5 5 記載のキットを用いて得られる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

15

5 7. 脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である請求項 5 6 記載の医薬。

20

5 8. 請求項 2、6、10、14、18、22、26、30、34、38 もしくは 4 2 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、請求項 1、5、9、13、17、21、25、29、33、37 または 4 1 記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

25

5 9. 請求項 2、6、10、14、18、22、26、30、34、38 もしくは 4 2 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を含んでなる、請求項 1、5、9、13、17、21、25、29、33、37 または 4 1 記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

60. 請求項58記載の方法または請求項59記載のキットを用いて得られる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

61. 脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である請求項60記載の医薬。

62. 請求項4、8、12、16、20、24、28、32、36、40または44記載の抗体を用いることを特徴とする、細胞膜もしくは細胞外液における請求項1、5、9、13、17、21、25、29、33、37または41記載の蛋白質またはその塩の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

63. 請求項4、8、12、16、20、24、28、32、36、40または44記載の抗体を含んでなる、細胞膜もしくは細胞外液における請求項1、5、9、13、17、21、25、29、33、37または41記載の蛋白質またはその塩の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

64. 請求項62記載の方法または請求項63記載のキットを用いて得られる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

65. 脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である請求項64記載の医薬。

1/51

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; Novel Proteins and Use Thereof

&lt;130&gt; 3083W00P

&lt;150&gt; JP 2002-201856

&lt;151&gt; 2002-07-10

&lt;160&gt; 48

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1836

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1833)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (1)..(69)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (70)..()

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (798)..(798)

&lt;223&gt; 'n' stands for unidentified base.

&lt;400&gt; 1

aig gct ggc agc agg ggc ctg cca ctc cta ctg ctg gtg ctt cag ctc	48
Met Ala Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu	
-20 -15 -10	

ttc ctg ggc cct gtg ctg cct gtg agg gca cct gtg ttt ggc cga agt	96
Phe Leu Gly Pro Val Leu Pro Val Arg Ala Pro Val Phe Gly Arg Ser	
-5 -1 1 5	

gac acc ccc acc ctg agc ccc gag gag aat gaa ttt gtg gag gaa gag	144
Asp Thr Pro Thr Leu Ser Pro Glu Glu Asn Glu Phe Val Glu Glu Glu	
10 15 20 25	

aat cag cca gtg ctg gtt ctg agc tcc gag gag cca gag cct ggc cca	192
Asn Gln Pro Val Leu Val Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu Pro Gly Pro	
30 35 40	

gcc act glc gac tgt ccc cga gal tgt gcc tgt tcc cag gaa ggt gta	240
Ala Thr Val Asp Cys Pro Arg Asp Cys Ala Cys Ser Gln Glu Gly Val	
45 50 55	

2/51

gig gac tgt ggt ggc att gac ctg cgt gag ttt cca ggc gac ctg ccc Val Asp Cys Gly Gly Ile Asp Leu Arg Glu Phe Pro Gly Asp Leu Pro 60 65 70	288
gag cac acc aac cat ctg tcc ttg cag aac aac cag ctg gag aag atc Glu His Thr Asn His Leu Ser Leu Gln Asn Asn Gln Leu Glu Lys Ile 75 80 85	336
tac ccc gag gag ctg tcc cgg ctg cag cgg ctg gag acg ctg aac ctg Tyr Pro Glu Glu Leu Ser Arg Leu Gln Arg Leu Glu Thr Leu Asn Leu 90 95 100 105	384
cag aac aac cgc ctg aca tcc cga ggg ctg cca gag gag gca ttt gag Gln Asn Asn Arg Leu Thr Ser Arg Gly Leu Pro Glu Glu Ala Phe Glu 110 115 120	432
cat ctt act agc ctg aat tac ctg tac ctg gcc aac aac aag ctg aca His Leu Thr Ser Leu Asn Tyr Leu Tyr Leu Ala Asn Asn Lys Leu Thr 125 130 135	480
ctg gca ccc cga ttc ctg cca aac gcc ctg atc agt gtg gac ttt gct Leu Ala Pro Arg Phe Leu Pro Asn Ala Leu Ile Ser Val Asp Phe Ala 140 145 150	528
gcc aat tat ctg act aag atc tat gga ctg acc ttt ggc caa aag cca Ala Asn Tyr Leu Thr Lys Ile Tyr Gly Leu Thr Phe Gly Gln Lys Pro 155 160 165	576
aat ctg agg tct gtg tac ctg cat aac aac aag cta gca gat gcc ggg Asn Leu Arg Ser Val Tyr Leu His Asn Asn Lys Leu Ala Asp Ala Gly 170 175 180 185	624
ctg ccg gac cac atg ttc aat ggc tcc agc aac gtc gag atc cta atc Leu Pro Asp His Met Phe Asn Gly Ser Ser Asn Val Glu Ile Leu Ile 190 195 200	672
ctg tcc agc aac ttc ctg cgc cat gtg ccc aag cac ctg cca ccc gct Leu Ser Ser Asn Phe Leu Arg His Val Pro Lys His Leu Pro Pro Ala 205 210 215	720
ctg tac aag ctg cac ctg aag aac aat aag cta gag aag atc ccc cct Leu Tyr Lys Leu His Leu Lys Asn Asn Lys Leu Glu Lys Ile Pro Pro 220 225 230	768
ggg gcc ttc agt gag ctg agc aac cta cgn gaa ctg tac ctg cag aac Gly Ala Phe Ser Glu Leu Ser Asn Leu Arg Glu Leu Tyr Leu Gln Asn 235 240 245	816
aac tac ctg acc gac gag ggt ctg gac aac gag acc ttc tgg aag ctg Asn Tyr Leu Thr Asp Glu Gly Leu Asp Asn Glu Thr Phe Trp Lys Leu 250 255 260 265	864
tcc agc ctg gag tac ctg gac ttg tcc agc acc aac ctg tgg agg gtc Ser Ser Leu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ser Thr Asn Leu Ser Arg Val 270 275 280	912
cca gcg ggt ctt ccc cgc agc ctg gtc ctg ctg cac ctg gag aaa aat Pro Ala Gly Leu Pro Arg Ser Leu Val Leu Leu His Leu Glu Lys Asn 285 290 295	960
gcc atc cag agc gla gaa gct gat gtg ctg aca ccc atc cgc aac ctg Ala Ile Gln Ser Val Glu Ala Asp Val Leu Thr Pro Ile Arg Asn Leu	1008



3/51

300	305	310	
gag lac ctg ctg cta cat agc aac cag ctg cag gcc aag ggt atc cac Glu Tyr Leu Leu Leu His Ser Asn Gln Leu Gln Ala Lys Gly Ile His 315 320 325			1056
cca ctg gcc ttc cag gcc ctg aag aag ctg cac aca gtg cat cta tac Pro Leu Ala Phe Gln Gly Leu Lys Lys Leu His Thr Val His Leu Tyr 330 335 340 345			1104
aac aac gcg ctg gaa cgt glg ccc agc gcc ctg ccc cgc cga glg cgc Asn Asn Ala Leu Glu Arg Val Pro Ser Gly Leu Pro Arg Arg Val Arg 350 355 360			1152
acc ctg atg atc ctg cac aac cag att aca gcc ata gcc cgt gag gac Thr Leu Met Ile Leu His Asn Gln Ile Thr Gly Ile Gly Arg Glu Asp 365 370 375			1200
ttc gct acc acc tac ttc ctg gaa gag ctg aac ctg agc tac aac cgc Phe Ala Thr Thr Tyr Phe Leu Glu Glu Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Arg 380 385 390			1248
atc acc agc cca cag atg cac cga gat gcc ttc cgc aag cta cgc ctg Ile Thr Ser Pro Gln Met His Arg Asp Ala Phe Arg Lys Leu Arg Leu 395 400 405			1296
ctg cgt tca ctt gac ttg tct gcc aac cgt ctg caa aca ctg cct cca Leu Arg Ser Leu Asp Leu Ser Gly Asn Arg Leu Gln Thr Leu Pro Pro 410 415 420 425			1344
ggc ctg ccg aaa aac gla cac glg ctg aag gtc aag cgg aat gag ctg Gly Leu Pro Lys Asn Val His Val Leu Lys Val Lys Arg Asn Glu Leu 430 435 440			1392
gct gcc ctg gca cgt ggg gca cta gct gcc atg gcc cag ctt cgg gaa Ala Ala Leu Ala Arg Gly Ala Leu Ala Gly Met Ala Gln Leu Arg Glu 445 450 455			1440
ctc tac ctg aca gcc aac cga ctg cga agc cgg gcc ctg gga ccc cgt Leu Tyr Leu Thr Gly Asn Arg Leu Arg Ser Arg Ala Leu Gly Pro Arg 460 465 470			1488
gcc lgg glg gac ctt gct ggt ctg cag ctg ctg gac atc gct ggg aat Ala Trp Val Asp Leu Ala Gly Leu Gln Leu Leu Asp Ile Ala Gly Asn 475 480 485			1536
cag ctg aca gag gtc cct gag ggg ctg ccc cca tct ctg gag tat ctg Gln Leu Thr Glu Val Pro Glu Gly Leu Pro Pro Ser Leu Glu Tyr Leu 490 495 500 505			1584
tac ctg cag aat aac aag att agt gcc gtt cct gcc aac gcc ttt gac Tyr Leu Gln Asn Asn Lys Ile Ser Ala Val Pro Ala Asn Ala Phe Asp 510 515 520			1632
tcc act ccc aac ctt aag ggg atc ttt ctg agg ttc aac aag ctg gct Ser Thr Pro Asn Leu Lys Gly Ile Phe Leu Arg Phe Asn Lys Leu Ala 525 530 535			1680
glg gcc tcc glg glg gaa agc gcc ttc cgg agg ctg aaa cac ctg cag Val Gly Ser Val Val Glu Ser Ala Phe Arg Arg Leu Lys His Leu Gln 540 545 550			1728

4/51

glc ttg gac att gaa ggc aac ttt gag ttt ggt aat ggt tcc aag gac 1776  
 Val Leu Asp Ile Glu Gly Asn Phe Glu Phe Gly Asn Gly Ser Lys Asp  
 555 560 565  
 aaa gat gag gaa gag gaa gaa gag gag gaa gag gaa gat gag gaa gag 1824  
 Lys Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu  
 570 575 580 585  
 gaa act aga tag 1836  
 Glu Thr Arg

<210> 2  
 <211> 611  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu  
 -20 -15 -10

Phe Leu Gly Pro Val Leu Pro Val Arg Ala Pro Val Phe Gly Arg Ser  
 -5 -1 1 5

Asp Thr Pro Thr Leu Ser Pro Glu Glu Asn Glu Phe Val Glu Glu Glu  
 10 15 20 25

Asn Gln Pro Val Leu Val Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu Pro Gly Pro  
 30 35 40

Ala Thr Val Asp Cys Pro Arg Asp Cys Ala Cys Ser Gln Glu Gly Val  
 45 50 55

Val Asp Cys Gly Gly Ile Asp Leu Arg Glu Phe Pro Gly Asp Leu Pro  
 60 65 70

Glu His Thr Asn His Leu Ser Leu Gln Asn Asn Gln Leu Glu Lys Ile  
 75 80 85

Tyr Pro Glu Glu Leu Ser Arg Leu Gln Arg Leu Glu Thr Leu Asn Leu  
 90 95 100 105

Gln Asn Asn Arg Leu Thr Ser Arg Gly Leu Pro Glu Glu Ala Phe Glu  
 110 115 120

His Leu Thr Ser Leu Asn Tyr Leu Tyr Leu Ala Asn Asn Lys Leu Thr  
 125 130 135

Leu Ala Pro Arg Phe Leu Pro Asn Ala Leu Ile Ser Val Asp Phe Ala  
 140 145 150

5/51

Ala Asn Tyr Leu Thr Lys Ile Tyr Gly Leu Thr Phe Gly Gln Lys Pro  
 155 160 165

Asn Leu Arg Ser Val Tyr Leu His Asn Asn Lys Leu Ala Asp Ala Gly  
 170 175 180 185

Leu Pro Asp His Met Phe Asn Gly Ser Ser Asn Val Glu Ile Leu Ile  
 190 195 200

Leu Ser Ser Asn Phe Leu Arg His Val Pro Lys His Leu Pro Pro Ala  
 205 210 215

Leu Tyr Lys Leu His Leu Lys Asn Asn Lys Leu Glu Lys Ile Pro Pro  
 220 225 230

Gly Ala Phe Ser Glu Leu Ser Asn Leu Arg Glu Leu Tyr Leu Gln Asn  
 235 240 245

Asn Tyr Leu Thr Asp Glu Gly Leu Asp Asn Glu Thr Phe Trp Lys Leu  
 250 255 260 265

Ser Ser Leu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ser Thr Asn Leu Ser Arg Val  
 270 275 280

Pro Ala Gly Leu Pro Arg Ser Leu Val Leu Leu His Leu Glu Lys Asn  
 285 290 295

Ala Ile Gln Ser Val Glu Ala Asp Val Leu Thr Pro Ile Arg Asn Leu  
 300 305 310

Glu Tyr Leu Leu Leu His Ser Asn Gln Leu Gln Ala Lys Gly Ile His  
 315 320 325

Pro Leu Ala Phe Gln Gly Leu Lys Lys Leu His Thr Val His Leu Tyr  
 330 335 340 345

Asn Asn Ala Leu Glu Arg Val Pro Ser Gly Leu Pro Arg Arg Val Arg  
 350 355 360

Thr Leu Met Ile Leu His Asn Gln Ile Thr Gly Ile Gly Arg Glu Asp  
 365 370 375

Phe Ala Thr Thr Tyr Phe Leu Glu Glu Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Arg  
 380 385 390

6/51

Ile Thr Ser Pro Gln Met His Arg Asp Ala Phe Arg Lys Leu Arg Leu  
 395 400 405

Leu Arg Ser Leu Asp Leu Ser Gly Asn Arg Leu Gln Thr Leu Pro Pro  
 410 415 420 425

Gly Leu Pro Lys Asn Val His Val Leu Lys Val Lys Arg Asn Glu Leu  
 430 435 440

Ala Ala Leu Ala Arg Gly Ala Leu Ala Gly Met Ala Gln Leu Arg Glu  
 445 450 455

Leu Tyr Leu Thr Gly Asn Arg Leu Arg Ser Arg Ala Leu Gly Pro Arg  
 460 465 470

Ala Trp Val Asp Leu Ala Gly Leu Gln Leu Leu Asp Ile Ala Gly Asn  
 475 480 485

Gln Leu Thr Glu Val Pro Glu Gly Leu Pro Pro Ser Leu Glu Tyr Leu  
 490 495 500 505

Tyr Leu Gln Asn Asn Lys Ile Ser Ala Val Pro Ala Asn Ala Phe Asp  
 510 515 520

Ser Thr Pro Asn Leu Lys Gly Ile Phe Leu Arg Phe Asn Lys Leu Ala  
 525 530 535

Val Gly Ser Val Val Glu Ser Ala Phe Arg Arg Leu Lys His Leu Gln  
 540 545 550

Val Leu Asp Ile Glu Gly Asn Phe Glu Phe Gly Asn Gly Ser Lys Asp  
 555 560 565

Lys Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu  
 570 575 580 585

Glu Thr Arg

<210> 3  
 <211> 480  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (477)  
 <223>

7/51

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(69)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (70)..()  
 <223>

<400> 3  
 aig gct ggc agc agg ggc ctg cca ctc cta ctg ctg glg ctt cag ctc 48  
 Met Ala Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu  
 -20 -15 -10

ttc ctg ggc cct glg ctg cct glg agg gca cct glg ttt ggc cga agt 96  
 Phe Leu Gly Pro Val Leu Pro Val Arg Ala Pro Val Phe Gly Arg Ser  
 -5 -1 1 5

gac acc ccc acc ctg agc ccc gag gag aat gaa ttt glg gag gaa gag 144  
 Asp Thr Pro Thr Leu Ser Pro Glu Glu Asn Glu Phe Val Glu Glu Glu  
 10 15 20 25

aal cag cca glg ctg gtt ctg agc tcc gag gag cca gag cct ggc cca 192  
 Asn Gln Pro Val Leu Val Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu Pro Gly Pro  
 30 35 40

gcc acf gtc gac tgt ccc cga gal tgt gcc tgt tcc cag gaa ggt gta 240  
 Ala Thr Val Asp Cys Pro Arg Asp Cys Ala Cys Ser Gln Glu Gly Val  
 45 50 55

glg gac tgt ggt ggc att gac ctg cgt gag ttt cca ggc gac ctg ccc 288  
 Val Asp Cys Gly Gly Ile Asp Leu Arg Glu Phe Pro Gly Asp Leu Pro  
 60 65 70

gag cac acc aac cat ctc tcc ttg cag aac aac cag ctg gag aag atc 336  
 Glu His Thr Asn His Leu Ser Leu Gln Asn Asn Gln Leu Glu Lys Ile  
 75 80 85

tac ccc gag gag ctg tcc cgg ctg cag cgg ctg gag acg ctg aac ctg 384  
 Tyr Pro Glu Glu Leu Ser Arg Leu Gln Arg Leu Glu Thr Leu Asn Leu  
 90 95 100 105

cag aac aac cgc ctg aca tcc cga gct gac acf ggc acc ccg att cct 432  
 Gln Asn Asn Arg Leu Thr Ser Arg Ala Asp Thr Gly Thr Pro Ile Pro  
 110 115 120

gcc aaa cgc cct gat cag tgt gga ctt tgc tgc caa tta tct cac taa 480  
 Ala Lys Arg Pro Asp Gln Cys Gly Leu Cys Cys Gln Leu Ser His  
 125 130 135

<210> 4  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 4  
 Met Ala Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu  
 -20 -15 -10

8/51

Phe Leu Gly Pro Val Leu Pro Val Arg Ala Pro Val Phe Gly Arg Ser  
 -5 -1 1 5

Asp Thr Pro Thr Leu Ser Pro Glu Glu Asn Glu Phe Val Glu Glu Glu  
 10 15 20 25

Asn Gln Pro Val Leu Val Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu Pro Gly Pro  
 30 35 40

Ala Thr Val Asp Cys Pro Arg Asp Cys Ala Cys Ser Gln Glu Gly Val  
 45 50 55

Val Asp Cys Gly Gly Ile Asp Leu Arg Glu Phe Pro Gly Asp Leu Pro  
 60 65 70

Glu His Thr Asn His Leu Ser Leu Gln Asn Asn Gln Leu Glu Lys Ile  
 75 80 85

Tyr Pro Glu Glu Leu Ser Arg Leu Gln Arg Leu Glu Thr Leu Asn Leu  
 90 95 100 105

Gln Asn Asn Arg Leu Thr Ser Arg Ala Asp Thr Gly Thr Pro Ile Pro  
 110 115 120

Ala Lys Arg Pro Asp Gln Cys Gly Leu Cys Cys Gln Leu Ser His  
 125 130 135

<210> 5  
 <211> 1092  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1089)  
 <223>

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(180)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (181)..()  
 <223>

<400> 5  
 atg gtc ggt tcc tgt ggt cgc tgc gca gcg gct ggc cga ctt ccg cag  
 Met Val Gly Ser Cys Gly Arg Cys Ala Ala Ala Gly Arg Leu Pro Gln  
 -60 -55 -50 -45

48

9/51

cgg gtc tgc ggc cac cga gcg ccg tct tca ccc agc gcc atg gct gtc Arg Val Ser Gly His Arg Ala Pro Ser Ser Pro Ser Ala Met Ala Val -40 -35 -30	96
gcc gct gtc ggc cgc ccg aga gcc ctg cgc tgc ccg ctg ttg ctc ctg Ala Ala Val Gly Arg Pro Arg Ala Leu Arg Cys Pro Leu Leu Leu Leu -25 -20 -15	144
ctg tca ctc ctg ctg gta gcc ggc cct gcg ctg ggc tgg aac gac cct Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala Gly Pro Ala Leu Gly Trp Asn Asp Pro -10 -5 -1 1	192
gac aga ala ctc ttg ccg gat gtc aaa gct ctt acc ctc tac tcc gac Asp Arg Ile Leu Leu Arg Asp Val Lys Ala Leu Thr Leu Tyr Ser Asp 5 10 15 20	240
cgc tac acc acc tcc ccg agg ctg gac cct atc cca cag ttg aag tgt Arg Tyr Thr Thr 25 Arg Arg Leu Asp Pro Ile Pro Gln Leu Lys Cys 30 35	288
glt gga ggc acc gcc ggt tgt gag gcc tat acc ccc agg gtg ata cag Val Gly Gly Thr 40 Ala Gly Cys Glu Ala Tyr Thr Pro Arg Val Ile Gln 45 50	336
tgc cag aac aaa ggc tgg gat ggc tac gat gta cag tgg gaa tgt aag Cys Gln Asn Lys Gly Trp Asp Gly Tyr Asp Val Gln Trp Glu Cys Lys 55 60 65	384
acc gac ttg gat att gca tac aaa ttt ggc aaa act gtc gtc agc tgt Thr Asp Leu Asp Ile Ala Tyr Lys Phe Gly Lys Thr Val Val Ser Cys 70 75 80	432
gaa ggc tac gag tcc tct gaa gac cag tat gtc ctc agg ggt tcc tgc Glu Gly Tyr Glu Ser Ser Glu Asp Gln Tyr Val Leu Arg Gly Ser Cys 85 90 95 100	480
ggc ttg gag tac aac tta gat tac aca gag ctg ggc ctg aag aaa ctg Gly Leu Glu Tyr Asn Leu Asp Tyr Thr Glu Leu Gly Leu Lys Lys Leu 105 110 115	528
aag gag tct gga aag cac cag ggc ttc tct gat tat tat cac aag ctg Lys Glu Ser Gly Lys His Gln Gly Phe Ser Asp Tyr Tyr His Lys Leu 120 125 130	576
tgc tcc tca gat tcc tgt ggc ttt att acc att gca gla ctg ttt gtt Cys Ser Ser Asp Ser Cys Gly Phe Ile Thr Ile Ala Val Leu Phe Val 135 140 145	624
ctc gcc ttt gcg gtt tac aag ctg ttc ctc agc gat ggc cag ggg tgc Leu Ala Phe Ala Val Tyr Lys Leu Phe Leu Ser Asp Gly Gln Gly Ser 150 155 160	672
cct ccg ccg tat tct gag cac ccg cca tac tca gag cac tct cag agg Pro Pro Pro Tyr Ser Glu His Pro Pro Tyr Ser Glu His Ser Gln Arg 165 170 175 180	720
ttt gcc agt gcc gca ggg gcg cct cct ccg ggc ttt aag tgc gag ttc Phe Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Pro Pro Gly Phe Lys Ser Glu Phe 185 190 195	768
aca gga cca cag aat act ggc tat ggt gca agc tct ggc ttc ggg agt Thr Gly Pro Gln Asn Thr Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Gly Phe Gly Ser 200 205 210 215 220	816

10/51

200	205	210	
gct ttt gga ggc caa ggc tat ggc agt tca ggg ccg ggg ttc tgg tct Ala Phe Gly Gly Gln Gly Tyr Gly Ser Ser Gly Pro Gly Phe Trp Ser 215 220 225			864
ggc ctg gga gct gga gga ctg ctt ggg tat ttg ttt ggc agc aac aga Gly Leu Gly Ala Gly Gly Leu Leu Gly Tyr Leu Phe Gly Ser Asn Arg 230 235 240			912
gcg gcg acg cct ttc tca gac tcg tgg tac cat cca gcc tac cct cct Ala Ala Thr Pro Phe Ser Asp Ser Trp Tyr His Pro Ala Tyr Pro Pro 245 250 255 260			960
tcc cac tct ggg gcc tgg aac agt cgg gcc tac tca ccc ctg ggt gga Ser His Ser Gly Ala Trp Asn Ser Arg Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Gly 265 270 275			1008
ggc gca ggg agc tat tgt gca tcc tct aat gca gac tcg aga acc aga Gly Ala Gly Ser Tyr Cys Ala Ser Ser Asn Ala Asp Ser Arg Thr Arg 280 285 290			1056
aca gca tca gga tat ggt ggc acc aga aga cgg taa Thr Ala Ser Gly Tyr Gly Gly Thr Arg Arg Arg 295 300			1092

<210> 6  
 <211> 363  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6

Met Val Gly Ser Cys Gly Arg Cys Ala Ala Gly Arg Leu Pro Gln  
 -60 -55 -50 -45

Arg Val Ser Gly His Arg Ala Pro Ser Ser Pro Ser Ala Met Ala Val  
 -40 -35 -30

Ala Ala Val Gly Arg Pro Arg Ala Leu Arg Cys Pro Leu Leu Leu Leu  
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala Gly Pro Ala Leu Gly Trp Asn Asp Pro  
 -10 -5 -1 1

Asp Arg Ile Leu Leu Arg Asp Val Lys Ala Leu Thr Leu Tyr Ser Asp  
 5 10 15 20

Arg Tyr Thr Thr Ser Arg Arg Leu Asp Pro Ile Pro Gln Leu Lys Cys  
 25 30 35

Val Gly Gly Thr Ala Gly Cys Glu Ala Tyr Thr Pro Arg Val Ile Gln  
 40 45 50



11/51

Cys Gln Asn Lys Gly Trp Asp Gly Tyr Asp Val Gln Trp Glu Cys Lys  
           55                          60                          65  
 Thr Asp Leu Asp Ile Ala Tyr Lys Phe Gly Lys Thr Val Val Ser Cys  
       70                          75                          80  
 Glu Gly Tyr Glu Ser Ser Glu Asp Gln Tyr Val Leu Arg Gly Ser Cys  
   85                          90                          95                         100  
 Gly Leu Glu Tyr Asn Leu Asp Tyr Thr Glu Leu Gly Leu Lys Lys Leu  
                          105                         110                         115  
 Lys Glu Ser Gly Lys His Gln Gly Phe Ser Asp Tyr Tyr His Lys Leu  
                          120                         125                         130  
 Cys Ser Ser Asp Ser Cys Gly Phe Ile Thr Ile Ala Val Leu Phe Val  
          135                         140                         145  
 Leu Ala Phe Ala Val Tyr Lys Leu Phe Leu Ser Asp Gly Gln Gly Ser  
      150                         155                         160  
 Pro Pro Pro Tyr Ser Glu His Pro Pro Tyr Ser Glu His Ser Gln Arg  
  165                         170                         175                         180  
 Phe Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Pro Pro Gly Phe Lys Ser Glu Phe  
                          185                         190                         195  
 Thr Gly Pro Gln Asn Thr Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Gly Phe Gly Ser  
                          200                         205                         210  
 Ala Phe Gly Gly Gln Gly Tyr Gly Ser Ser Gly Pro Gly Phe Trp Ser  
      215                         220                         225  
 Gly Leu Gly Ala Gly Gly Leu Leu Gly Tyr Leu Phe Gly Ser Asn Arg  
      230                         235                         240  
 Ala Ala Thr Pro Phe Ser Asp Ser Trp Tyr His Pro Ala Tyr Pro Pro  
  245                         250                         255                         260  
 Ser His Ser Gly Ala Trp Asn Ser Arg Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Gly  
                          265                         270                         275  
 Gly Ala Gly Ser Tyr Cys Ala Ser Ser Asn Ala Asp Ser Arg Thr Arg  
      280                         285                         290  
 Thr Ala Ser Gly Tyr Gly Gly Thr Arg Arg Arg  
      295                         300

12/51

<210> 7  
 <211> 1005  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1002)  
 <223>

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(93)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (94)..0  
 <223>

<400> 7  
 atg gct gtc gcc gct gtc ggc cgc ccg aga gcc ctg cgc tgc ccg ctg 48  
 Met Ala Val Ala Ala Val Gly Arg Pro Arg Ala Leu Arg Cys Pro Leu  
 -30 -25 -20

ttg ctc ctg ctg tca ctc ctg ctg gta gcc ggc cct gcg ctg ggc tgg 96  
 Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Val Ala Gly Pro Ala Leu Gly Trp  
 -15 -10 -5 -1 1

aac gac cct gac aga ata ctc ttg cgg gal gtg aaa gct ctt acc ctc 144  
 Asn Asp Pro Asp Arg Ile Leu Leu Arg Asp Val Lys Ala Leu Thr Leu  
 5 10 15

tac tcc gac cgc tac acc acc tcc cgg agg ctg gac cct atc cca cag 192  
 Tyr Ser Asp Arg Tyr Thr Thr Ser Arg Arg Leu Asp Pro Ile Pro Gln  
 20 25 30

ttg aag tgt gtt gga ggc acc gcc ggt tgt gag gcc tat acc ccc agg 240  
 Leu Lys Cys Val Gly Gly Thr Ala Gly Cys Glu Ala Tyr Thr Pro Arg  
 35 40 45

gtg ala cag tgc cag aac aaa ggc tgg gal ggc tac gal gta cag tgg 288  
 Val Ile Gln Cys Gln Asn Lys Gly Trp Asp Gly Tyr Asp Val Gln Trp  
 50 55 60 65

gaa tgt aag acc gac ttg gat att gca tac aaa ttt ggc aaa act gtg 336  
 Glu Cys Lys Thr Asp Leu Asp Ile Ala Tyr Lys Phe Gly Lys Thr Val  
 70 75 80

gtg agc tgt gaa ggc tac gag tcc tct gaa gac cag tat gtc ctc agg 384  
 Val Ser Cys Glu Gly Tyr Glu Ser Ser Glu Asp Gln Tyr Val Leu Arg  
 85 90 95

ggt tcc tgc ggc ttg gag tac aac tta gat tac aca gag ctg ggc ctg 432  
 Gly Ser Cys Gly Leu Glu Tyr Asn Leu Asp Tyr Thr Glu Leu Gly Leu  
 100 105 110

aag aaa ctg aag gag tct gga aag cac cag ggc ttc tct gat tat tat 480  
 Lys Lys Leu Lys Glu Ser Gly Lys His Gln Gly Phe Ser Asp Tyr Tyr  
 115 120 125

13/51

cac aag ctg tgc tcc tca gat tcc tgt ggc ttt att acc att gca gta 528  
 His Lys Leu Cys Ser Ser Asp Ser Cys Gly Phe Ile Thr Ile Ala Val  
 130 135 140 145

ctg ttt gtt ctg gcc ttt gcg gtt tac aag ctg ttc ctg agc gat ggc 576  
 Leu Phe Val Leu Ala Phe Ala Val Tyr Lys Leu Phe Leu Ser Asp Gly  
 150 155 160

cag ggg tgc cct ccg ccg tat tct gag cac ccg cca tac tca gag cac 624  
 Gln Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Ser Glu His Pro Pro Tyr Ser Glu His  
 165 170 175

tct cag agg ttt gcc agt gcc gca ggg gcg cct cct ccg ggc ttt aag 672  
 Ser Gln Arg Phe Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Pro Pro Gly Phe Lys  
 180 185 190

tgc gag ttc aca gga cca cag aat act ggc tat ggt gca agc tct ggc 720  
 Ser Glu Phe Thr Gly Pro Gln Asn Thr Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Gly  
 195 200 205

ttc ggg agt gct ttt gga ggc caa ggc tat ggc agt tca ggg ccg ggc 768  
 Phe Gly Ser Ala Phe Gly Gly Gln Gly Tyr Gly Ser Ser Gly Pro Gly  
 210 215 220 225

ttc tgg tct ggc ctg gga gct gga gga ctg ctt ggg tat ttg ttt ggc 816  
 Phe Trp Ser Gly Leu Gly Ala Gly Gly Leu Leu Gly Tyr Leu Phe Gly  
 230 235 240

agc aac aga gcg gcg acg cct ttc tca gac tgc tgg tac cat cca gcc 864  
 Ser Asn Arg Ala Ala Thr Pro Phe Ser Asp Scr Trp Tyr His Pro Ala  
 245 250 255

tac cct cct tcc cac tct ggg gcc tgg aac agt cgg gcc tac tca ccc 912  
 Tyr Pro Pro Ser His Ser Gly Ala Trp Asn Ser Arg Ala Tyr Ser Pro  
 260 265 270

ctg ggt gga ggc gca ggg agc tat tgt gca tcc tct aat gca gac tgc 960  
 Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ser Tyr Cys Ala Ser Ser Asn Ala Asp Ser  
 275 280 285

aga acc aga aca gca tca gga tat ggt ggc acc aga aga cgg taa 1005  
 Arg Thr Arg Thr Ala Ser Gly Tyr Gly Gly Thr Arg Arg Arg  
 290 295 300

<210> 8  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 8

Met Ala Val Ala Ala Val Gly Arg Pro Arg Ala Leu Arg Cys Pro Leu  
 -30 -25 -20

Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala Gly Pro Ala Leu Gly Trp  
 -15 -10 -5 -1 1

Asn Asp Pro Asp Arg Ile Leu Leu Arg Asp Val Lys Ala Leu Thr Leu

14/51

	5		10		15														
Tyr	Ser	Asp	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ser	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Ile	Pro	Gln				
		20					25					30							
Leu	Lys	Cys	Val	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Cys	Glu	Ala	Tyr	Thr	Pro	Arg				
	35					40					45								
Val	Ile	Gln	Cys	Gln	Asn	Lys	Gly	Trp	Asp	Gly	Tyr	Asp	Val	Gln	Trp				
	50				55					60					65				
Glu	Cys	Lys	Thr	Asp	Leu	Asp	Ile	Ala	Tyr	Lys	Phe	Gly	Lys	Thr	Val				
				70					75					80					
Val	Ser	Cys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Gln	Tyr	Val	Leu	Arg				
			85					90					95						
Gly	Ser	Cys	Gly	Leu	Glu	Tyr	Asn	Leu	Asp	Tyr	Thr	Glu	Leu	Gly	Leu				
		100					105					110							
Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Lys	His	Gln	Gly	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr				
	115					120					125								
His	Lys	Leu	Cys	Ser	Ser	Asp	Ser	Cys	Gly	Phe	Ile	Thr	Ile	Ala	Val				
	130				135					140					145				
Leu	Phe	Val	Leu	Ala	Phe	Ala	Val	Tyr	Lys	Leu	Phe	Leu	Ser	Asp	Gly				
			150						155					160					
Gln	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Tyr	Ser	Glu	His	Pro	Pro	Tyr	Ser	Glu	His				
			165					170					175						
Ser	Gln	Arg	Phe	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Gly	Phe	Lys				
		180					185						190						
Ser	Glu	Phe	Thr	Gly	Pro	Gln	Asn	Thr	Gly	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly				
	195					200					205								
Phe	Gly	Ser	Ala	Phe	Gly	Gly	Gln	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Pro	Gly				
	210				215					220				225					
Phe	Trp	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Phe	Gly				
			230						235					240					
Ser	Asn	Arg	Ala	Ala	Thr	Pro	Phe	Ser	Asp	Ser	Trp	Tyr	His	Pro	Ala				
			245					250					255						

15/51.

Tyr Pro Pro Ser His Ser Gly Ala Trp Asn Ser Arg Ala Tyr Ser Pro  
260 265 270

Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ser Tyr Cys Ala Ser Ser Asn Ala Asp Ser  
275 280 285

Arg Thr Arg Thr Ala Ser Gly Tyr Gly Gly Thr Arg Arg Arg  
290 295 300

$\langle 210 \rangle$	9
$\langle 211 \rangle$	1053
$\langle 212 \rangle$	DNA
$\langle 213 \rangle$	Mus musculus

$\langle 220 \rangle$   
 $\langle 221 \rangle$  CDS  
 $\langle 222 \rangle$  (1) .. (1050)  
 $\langle 223 \rangle$

```

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(66)
<223>

```

```

<220>
<221> mat_peptide
<222> (67)..()
<223>

```

<400>	9																	
alg	cac	ctg	ctg	ctt	gca	gcc	gcg	ttc	ggg	cig	cig	cig	cig	cig	ccg		48	
Met	His	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro			
		-20					-15					-10						
ccg	ccc	ggg	gcc	gta	gcc	icc	cgg	aag	ccg	acg	atg	igc	cag	aga	igc		96	
Pro	Pro	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Arg	Lys	Pro	Thr	Met	Cys	Gln	Arg	Cys			
	-5				-1	1				5					10			
cgg	acg	ctg	gtg	gac	aag	ttc	aac	cag	ggg	atg	gcc	aac	acg	gcc	agg		144	
Arg	Thr	Leu	Val	Asp	Lys	Phe	Asn	Gln	Gly	Met	Ala	Asn	Thr	Ala	Arg			
				15					20					25				
aag	aat	ttc	ggt	ggc	ggc	aac	acg	gcg	igg	gaa	gag	aag	acg	cig	tct		192	
Lys	Asn	Phe	Gly	Gly	Gly	Asn	Thr	Ala	Trp	Glu	Glu	Lys	Thr	Leu	Ser			
			30					35					40					
aag	tac	gaa	ttc	agt	gag	atc	cgg	ctt	cig	gag	atc	atg	gag	ggt	cig		240	
Lys	Tyr	Glu	Phe	Ser	Glu	Ile	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Met	Glu	Gly	Leu			
		45					50					55						
tgt	gac	agc	agt	gac	ttt	gag	igc	aac	caa	cic	tig	gag	cag	cag	gag		288	
Cys	Asp	Ser	Ser	Asp	Phe	Glu	Cys	Asn	Gln	Leu	Leu	Glu	Gln	Gln	Glu			
	60					65					70							
gag	cag	cta	gag	gct	igg	igg	cag	aca	cig	aag	aag	gag	cac	ccc	aac		336	
Glu	Gln	Leu	Glu	Ala	Trp	Trp	Gln	Thr	Leu	Lys	Lys	Glu	His	Pro	Asn			
75					80					85					90			

16/51

cla ttt gag tgg ttc tgt gla cac aca ctg aaa gcg tgc tgt ctt cca Leu Phe Glu Trp Phe Cys Val His Thr Leu Lys Ala Cys Cys Leu Pro 95 100 105	384
ggc acc tac ggg cca gac tgt caa aag tgc cag ggt ggg tcc gag agg Gly Thr Tyr Gly Pro Asp Cys Gln Lys Cys Gln Gly Gly Ser Glu Arg 110 115 120	432
ccf tgc agc gga aac ggc tat tgc agc gga gac ggc agc aga cag ggc Pro Cys Ser Gly Asn Gly Tyr Cys Ser Gly Asp Gly Ser Arg Gln Gly 125 130 135	480
gac ggg tcc tgc cag tgt cac aca ggc tac aag gga cca ctg tgt att Asp Gly Ser Cys Gln Cys His Thr Gly Tyr Lys Gly Pro Leu Cys Ile 140 145 150	528
gac tgc aca gac ggc ttc ttc agc ttg cag agg aac gag acc cac agc Asp Cys Thr Asp Gly Phe Phe Ser Leu Gln Arg Asn Glu Thr His Ser 155 160 165 170	576
alc tgc tca gcc tgt gal gag tct tgc aag acc tgc tct ggt cca agc Ile Cys Ser Ala Cys Asp Glu Ser Cys Lys Thr Cys Ser Gly Pro Ser 175 180 185	624
aac aaa gac tgt atc cag tgt gaa gtg ggc tgg gca cgt gtg gag gal Asn Lys Asp Cys Ile Gln Cys Glu Val Gly Trp Ala Arg Val Glu Asp 190 195 200	672
gcc tgt gtg gal gtg gal gag tgt gca gca gag aca tct ccg tgc agc Ala Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Ala Glu Thr Ser Pro Cys Ser 205 210 215	720
gal ggc cag tac tgt gag aat gtc aac ggc tgc tac aca tgt gaa gac Asp Gly Gln Tyr Cys Glu Asn Val Asn Gly Ser Tyr Thr Cys Glu Asp 220 225 230	768
tgt gat tct acc tgc gtg ggc tgt aca gga aaa ggc cca gcc aac tgt Cys Asp Ser Thr Cys Val Gly Cys Thr Gly Lys Gly Pro Ala Asn Cys 235 240 245 250	816
aag gag tgt att gcc ggc tac acc aag gag agt gga cag tgc aca gat Lys Glu Cys Ile Ala Gly Tyr Thr Lys Glu Ser Gly Gln Cys Thr Asp 255 260 265	864
ala gat gaa tgc tca cta gaa gaa aaa gcc tgt aag agg aaa aac gaa Ile Asp Glu Cys Ser Leu Glu Glu Lys Ala Cys Lys Arg Lys Asn Glu 270 275 280	912
aac tgc tac aat gtt ccg ggg agc ttc gtg tgc gtg tgt ccg gaa ggc Asn Cys Tyr Asn Val Pro Gly Ser Phe Val Cys Val Cys Pro Glu Gly 285 290 295	960
ttt gag gag aca gaa gac gct tgt gtg cag aca gca gaa ggc aaa gtc Phe Glu Glu Thr Glu Asp Ala Cys Val Gln Thr Ala Glu Gly Lys Val 300 305 310	1008
aca gag gaa aac ccc aca cag cca ccc tcc cgt gag gat ttg tga Thr Glu Glu Asn Pro Thr Gln Pro Pro Ser Arg Glu Asp Leu 315 320 325	1053

17/51

<211> 350  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 10

Met His Leu Leu Leu Ala Ala Ala Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Pro  
 -20 -15 -10

Pro Pro Gly Ala Val Ala Ser Arg Lys Pro Thr Met Cys Gln Arg Cys  
 -5 -1 1 5 10

Arg Thr Leu Val Asp Lys Phe Asn Gln Gly Met Ala Asn Thr Ala Arg  
 15 20 25

Lys Asn Phe Gly Gly Gly Asn Thr Ala Trp Glu Glu Lys Thr Leu Ser  
 30 35 40

Lys Tyr Glu Phe Ser Glu Ile Arg Leu Leu Glu Ile Met Glu Gly Leu  
 45 50 55

Cys Asp Ser Ser Asp Phe Glu Cys Asn Gln Leu Leu Glu Gln Gln Glu  
 60 65 70

Glu Gln Leu Glu Ala Trp Trp Gln Thr Leu Lys Lys Glu His Pro Asn  
 75 80 85 90

Leu Phe Glu Trp Phe Cys Val His Thr Leu Lys Ala Cys Cys Leu Pro  
 95 100 105

Gly Thr Tyr Gly Pro Asp Cys Gln Lys Cys Gln Gly Gly Ser Glu Arg  
 110 115 120

Pro Cys Ser Gly Asn Gly Tyr Cys Ser Gly Asp Gly Ser Arg Gln Gly  
 125 130 135

Asp Gly Ser Cys Gln Cys His Thr Gly Tyr Lys Gly Pro Leu Cys Ile  
 140 145 150

Asp Cys Thr Asp Gly Phe Phe Ser Leu Gln Arg Asn Glu Thr His Ser  
 155 160 165 170

Ile Cys Ser Ala Cys Asp Glu Ser Cys Lys Thr Cys Ser Gly Pro Ser  
 175 180 185

Asn Lys Asp Cys Ile Gln Cys Glu Val Gly Trp Ala Arg Val Glu Asp  
 190 195 200

18/51

Ala Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Ala Glu Thr Ser Pro Cys Ser  
205 210 215

Asp Gly Gln Tyr Cys Glu Asn Val Asn Gly Ser Tyr Thr Cys Glu Asp  
220 225 230

Cys Asp Ser Thr Cys Val Gly Cys Thr Gly Lys Gly Pro Ala Asn Cys  
235 240 245 250

Lys Glu Cys Ile Ala Gly Tyr Thr Lys Glu Ser Gly Gln Cys Thr Asp  
255 260 265

Ile Asp Glu Cys Ser Leu Glu Glu Lys Ala Cys Lys Arg Lys Asn Glu  
270 275 280

Asn Cys Tyr Asn Val Pro Gly Ser Phe Val Cys Val Cys Pro Glu Gly  
285 290 295

Phe Glu Glu Thr Glu Asp Ala Cys Val Gln Thr Ala Glu Gly Lys Val  
300 305 310

Thr Glu Glu Asn Pro Thr Gln Pro Pro Ser Arg Glu Asp Leu  
315 320 325

<210> 11  
<211> 1254  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1251)  
<223>

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (1)..(99)  
<223>

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (100)..()  
<223>

<400> 11  
atg ccc ccg cgc cca gga cgc ctc ctc cag ccg ctg gcc ggg ctg ccg 48  
Met Pro Pro Arg Pro Gly Arg Leu Leu Gln Pro Leu Ala Gly Leu Pro  
-30 -25 -20

gcc ctg gcc acg ctc ctg ctg ctg ctc ggg gcg cgc aaa ggc gcc ccg 96  
Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Gly Ala Arg Lys Gly Ala Arg  
-15 -10 -5

gcc cag gag glg gaa gcg gac agc ggg glc gag cag gac ccg cac gcc 144



19/51

Ala	Gln	Glu	Val	Glu	Ala	Asp	Ser	Gly	Val	Glu	Gln	Asp	Pro	His	Ala		
-1	1				5					10					15		
aag	cac	ctg	tat	acg	gcc	gac	atg	ttc	acg	cac	ggg	atc	cag	agc	gcc	192	
Lys	His	Leu	Tyr	Thr	Ala	Asp	Met	Phe	Thr	His	Gly	Ile	Gln	Ser	Ala		
				20					25					30			
gcg	cac	ttc	gtc	atg	ttc	ttc	gcg	ccc	tgg	tgt	gga	cac	tgc	cag	cgg	240	
Ala	His	Phe	Val	Met	Phe	Phe	Ala	Pro	Trp	Cys	Gly	His	Cys	Gln	Arg		
			35					40					45				
ctg	cag	cca	act	lgg	aal	gac	ctg	gga	gac	aag	tac	aac	agc	atg	gag	288	
Leu	Gln	Pro	Thr	Trp	Asn	Asp	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Asn	Ser	Met	Glu		
		50				55						60					
gat	gcc	aag	gtc	tac	gtg	gcc	aaa	gig	gac	lgc	acg	gci	gat	tcc	gac	336	
Asp	Ala	Lys	Val	Tyr	Val	Ala	Lys	Val	Asp	Cys	Thr	Ala	Asp	Ser	Asp		
	65					70					75						
gtg	lgc	lcl	gcc	cag	gga	gtg	cga	gga	tac	ccc	acc	ctg	aag	ttt	ttt	384	
Val	Cys	Ser	Ala	Gln	Gly	Val	Arg	Gly	Tyr	Pro	Thr	Leu	Lys	Phe	Phe		
80				85					90					95			
aag	cci	gga	caa	gaa	gca	gtg	aag	tac	cag	ggt	cci	aga	gac	ttt	gaa	432	
Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Val	Lys	Tyr		Gln	Gly	Pro	Arg	Asp	Phe	Glu		
			100						105					110			
aca	ctg	gaa	aac	tgg	atg	ctg	cag	aca	ctg	aac	gag	gag	cca	gcc	aca	480	
Thr	Leu	Glu	Asn	Trp	Met	Leu	Gln	Thr	Leu	Asn	Glu	Glu	Pro	Ala	Thr		
			115				120						125				
ccg	gag	ccg	gaa	gcg	gaa	cca	ccc	aga	gcc	cci	gag	cic	aaa	cag	ggg	528	
Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Glu	Pro	Pro	Arg	Ala	Pro	Glu	Leu	Lys	Gln	Gly		
		130					135					140					
ttg	tat	gag	cic	tgc	gcc	aac	aac	ttt	gag	ctg	cat	gtt	lcl	caa	ggc	576	
Leu	Tyr	Glu	Leu	Ser	Ala	Asn	Asn	Phe	Glu	Leu	His	Val	Ser	Gln	Gly		
	145					150					155						
aac	cac	ttt	atc	aag	ttc	ttc	gct	ccg	lgg	lgc	ggt	cac	tgc	aaa	gct	624	
Asn	His	Phe	Ile	Lys	Phe	Phe	Ala	Pro	Trp	Cys	Gly	His	Cys	Lys	Ala		
	160				165				170					175			
ctg	gct	cca	acc	lgg	gag	cag	ctg	gct	ctg	ggc	cit	gaa	cat	tct	gaa	672	
Leu	Ala	Pro	Thr	Trp	Glu	Gln	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Glu	His	Ser	Glu		
				180					185					190			
acc	gtc	aag	att	ggc	aag	gtt	gac	tgc	acg	cag	cac	tac	gct	gtc	tgc	720	
Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Lys	Val	Asp	Cys	Thr	Gln	His	Tyr	Ala	Val	Cys		
			195				200						205				
tca	gag	cat	cag	gtc	aga	ggc	tat	cca	act	ctg	cic	tgg	ttt	cga	gat	768	
Ser	Glu	His	Gln	Val	Arg	Gly	Tyr	Pro	Thr	Leu	Leu	Trp	Phe	Arg	Asp		
		210				215						220					
ggc	aag	aag	gtg	gat	cag	tac	aag	gga	aag	cgg	gac	tig	gag	tca	ctg	816	
Gly	Lys	Lys	Val	Asp	Gln	Tyr	Lys	Gly	Lys	Arg	Asp	Leu	Glu	Ser	Leu		
	225				230						235						
aga	gac	tat	gtg	cag	tcc	cag	ctg	cag	ggt	tca	gag	gca	gct	ccg	gag	864	
Arg	Asp	Tyr	Val	Gln	Ser	Gln	Leu	Gln	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala	Pro	Glu		
240					245				250						255		

20/51

act gtt gag ccg tca gag gcc cca gtg atg gct gct gag ccc acg ggt 912  
 Thr Val Glu Pro Ser Glu Ala Pro Val Met Ala Ala Glu Pro Thr Gly  
 260 265 270

gac aag ggc act gtg ctg gca ctc acc gag aag agc ttc gag gac act 960  
 Asp Lys Gly Thr Val Leu Ala Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Asp Thr  
 275 280 285

att gca cag ggg ata acc ttc gtc aag ttc tat gct ccg tgg tgt ggc 1008  
 Ile Ala Gln Gly Ile Thr Phe Val Lys Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly  
 290 295 300

cac tgt aag aat ctg gct cct acc tgg gag gag ctc tct aaa aag gaa 1056  
 His Cys Lys Asn Leu Ala Pro Thr Trp Glu Glu Leu Ser Lys Lys Glu  
 305 310 315

ttc cca ggc ttg tca gat gtc acc atc gca gaa gtg gac tgc acc gct 1104  
 Phe Pro Gly Leu Ser Asp Val Thr Ile Ala Glu Val Asp Cys Thr Ala  
 320 325 330 335

gag cgc aat gtc tgc agc aag tac tgc gta cga ggt tat ccc acg ttg 1152  
 Glu Arg Asn Val Cys Ser Lys Tyr Ser Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu  
 340 345 350

ccg ctt ttc cga gga ggt gaa aaa gtg gga gac cac aac gga ggt aga 1200  
 Pro Leu Phe Arg Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp His Asn Gly Gly Arg  
 355 360 365

gac ctc gac tcc tta cac agc ttt gtt ctg cgc cag gca aag gat gaa 1248  
 Asp Leu Asp Ser Leu His Ser Phe Val Leu Arg Gln Ala Lys Asp Glu  
 370 375 380

cta tag 1254  
 Leu

<210> 12  
 <211> 417  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 12

Met Pro Pro Arg Pro Gly Arg Leu Leu Gln Pro Leu Ala Gly Leu Pro  
-30 -25 -20

Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Gly Ala Arg Lys Gly Ala Arg  
-15 -10 -5

Ala Gln Glu Val Glu Ala Asp Ser Gly Val Glu Gln Asp Pro His Ala  
-1 1 5 10 15

Lys His Leu Tyr Thr Ala Asp Met Phe Thr His Gly Ile Gln Ser Ala  
20 25 30

Ala His Phe Val Met Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Gln Arg

21/51

	35		40		45	
Leu	Gln	Pro	Thr	Trp	Asn	Asp
	50				55	
Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Asn	Ser
					60	
Asp	Ala	Lys	Val	Tyr	Val	Ala
	65				70	
Ala	Lys	Val	Asp	Cys	Thr	Ala
					75	
Val	Cys	Ser	Ala	Gln	Gly	Val
	80				85	
Arg	Gly	Tyr	Pro	Thr	Leu	Lys
			90			
Phe	Phe					
	95					
Lys	Pro	Gly	Gln	Glu	Ala	Val
			100			
Lys	Tyr	Gln	Gly	Pro	Arg	Asp
			105			
Phe	Glu					
	110					
Thr	Leu	Glu	Asn	Trp	Met	Leu
			115			
Gln	Thr	Leu	Asn	Glu	Glu	Pro
			120			
Ala	Thr					
	125					
Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Glu	Pro
	130					
Pro	Arg	Ala	Pro	Glu	Leu	Lys
			135			
Gln	Gly					
	140					
Leu	Tyr	Glu	Leu	Ser	Ala	Asn
	145					
Asn	Asn	Phe	Glu	Leu	His	Val
					150	
Ser	Gln	Gly				
	155					
Asn	His	Phe	Ile	Lys	Phe	Phe
	160					
Ala	Pro	Trp	Cys	Gly	His	Cys
			165			
Lys	Ala					
	170					
Ala	Thr					
	175					
Leu	Ala	Pro	Thr	Trp	Glu	Gln
Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Glu	His
			180			
Ser	Glu					
	185					
His	Ser	Glu				
	190					
Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Lys	Val
			195			
Asp	Cys	Thr	Gln	His	Tyr	Ala
			200			
Val	Cys					
	205					
Ser	Glu	His	Gln	Val	Arg	Gly
Tyr	Pro	Thr	Leu	Leu	Trp	Phe
			210			
Arg	Asp					
	215					
Leu	Glu	Ser	Leu			
	220					
Gly	Lys	Lys	Val	Asp	Gln	Tyr
Lys	Gly	Lys	Arg	Asp	Leu	Glu
Ser	Leu					
	225					
Arg	Asp	Tyr	Val	Gln	Ser	Gln
Leu	Gln	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala
Pro	Glu					
	230					
Thr	Val	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala
Met	Ala	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	240					
Asp	Lys	Gly	Thr	Val	Leu	Ala
Leu	Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu
Asp	Thr					
	245					
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	250					
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	255					
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	260					
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	265					
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	270					
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	275					
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	280					
Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp
Thr						
	285					

22/51

Ile Ala Gln Gly Ile Thr Phe Val Lys Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly  
 290 295 300

His Cys Lys Asn Leu Ala Pro Thr Trp Glu Glu Leu Ser Lys Lys Glu  
 305 310 315

Phe Pro Gly Leu Ser Asp Val Thr Ile Ala Glu Val Asp Cys Thr Ala  
 320 325 330 335

Glu Arg Asn Val Cys Ser Lys Tyr Ser Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu  
 340 345 350

Pro Leu Phe Arg Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp His Asn Gly Gly Arg  
 355 360 365

Asp Leu Asp Ser Leu His Ser Phe Val Leu Arg Gln Ala Lys Asp Glu  
 370 375 380

Leu

<210> 13  
 <211> 843  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(840)  
 <223>

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(99)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (100)..()  
 <223>

<400> 13  
 atg ccc ccg cgc cca gga cgc ctc ctc cag ccg ctg gcc ggg ctg ccg 48  
 Met Pro Pro Arg Pro Gly Arg Leu Leu Gln Pro Leu Ala Gly Leu Pro  
 -30 -25 -20

gcc ctg gcc acg ctc ctg ctg ctg ctc ggg gcg cgc aaa ggc gcc ccg 96  
 Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Gly Ala Arg Lys Gly Ala Arg  
 -15 -10 -5

gcc cag gag gtg gaa gcg gac agc ggg gtc gag cag gac ccg cac gcc 144  
 Ala Gln Glu Val Glu Ala Asp Ser Gly Val Glu Gln Asp Pro His Ala  
 -1 1 5 10 15

23/51

aag cac ctg tat acg gcc gac atg ttc acg cac ggg atc cag agc gcc Lys His Leu Tyr Thr Ala Asp Met Phe Thr His Gly Ile Gln Ser Ala 20 25 30	192
gcg cac ttc gtc atg ttc ttc gcg ccc tgg tgt gga cac tgc cag cgg Ala His Phe Val Met Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Gln Arg 35 40 45	240
ctg cag cca act tgg aat gac ctg gga gac aag tac aac agc atg gag Leu Gln Pro Thr Trp Asn Asp Leu Gly Asp Lys Tyr Asn Ser Met Glu 50 55 60	288
gat gcc aag gtc tac gtg gcc aaa gtg gac tgc acg gct gat tcc gac Asp Ala Lys Val Tyr Val Ala Lys Val Asp Cys Thr Ala Asp Ser Asp 65 70 75	336
gtg tgc tct gcc cag gga gtg cga gga tac ccc acc ctg aag ttt ttt Val Cys Ser Ala Gln Gly Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Phe Phe 80 85 90 95	384
aag cct gga caa gaa gca gtg aag tac cag ggt cct aga gac ttt gaa Lys Pro Gly Gln Glu Ala Val Lys Tyr Gln Gly Pro Arg Asp Phe Glu 100 105 110	432
aca ctg gaa aac tgg atg ctg cag aca ctg aac gag gag cca gcc aca Thr Leu Glu Asn Trp Met Leu Gln Thr Leu Asn Glu Glu Pro Ala Thr 115 120 125	480
ccg gag ccg gaa gcg gaa cca ccc aga gcc cct gag ctg aaa cag ggg Pro Glu Pro Glu Ala Glu Pro Pro Arg Ala Pro Glu Leu Lys Gln Gly 130 135 140	528
ttg tat gag ctg tcg gcc aac aac ttt gag ctg cat gtt tct caa ggc Leu Tyr Glu Leu Ser Ala Asn Asn Phe Glu Leu His Val Ser Gln Gly 145 150 155	576
aac cac ttt atc aag ttc ttc gct ccg tgg tgc ggt cac tgc aaa gct Asn His Phe Ile Lys Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala 160 165 170 175	624
ctg gct cca acc tgg gag cag ctg gct ctg ggc ctt gaa cat tct gaa Leu Ala Pro Thr Trp Glu Gln Leu Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Glu 180 185 190	672
acc gtc aag att ggc aag gtt gac tgc acg cag cac tac gct gtc tgc Thr Val Lys Ile Gly Lys Val Asp Cys Thr Gln His Tyr Ala Val Cys 195 200 205	720
tca gag cat cag gtc aga ggc tat cca act ctg ctg tgg ttt cga gat Ser Glu His Gln Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Leu Trp Phe Arg Asp 210 215 220	768
ggc aag aag gtg gat cag tac aag gga aag cgg gac ttg gag tca ctg Gly Lys Lys Val Asp Gln Tyr Lys Gly Lys Arg Asp Leu Glu Ser Leu 225 230 235	816
aga gac tat gtg cag tcc cag ctg tag Arg Asp Tyr Val Gln Ser Gln Leu 240 245	843

24/51

<211> 280  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 14

Met Pro Pro Arg Pro Gly Arg Leu Leu Gln Pro Leu Ala Gly Leu Pro  
 -30 -25 -20

Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Arg Lys Gly Ala Arg  
 -15 -10 -5

Ala Gln Glu Val Glu Ala Asp Ser Gly Val Glu Gln Asp Pro His Ala  
 -1 1 5 10 15

Lys His Leu Tyr Thr Ala Asp Met Phe Thr His Gly Ile Gln Ser Ala  
 20 25 30

Ala His Phe Val Met Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Gln Arg  
 35 40 45

Leu Gln Pro Thr Trp Asn Asp Leu Gly Asp Lys Tyr Asn Ser Met Glu  
 50 55 60

Asp Ala Lys Val Tyr Val Ala Lys Val Asp Cys Thr Ala Asp Ser Asp  
 65 70 75

Val Cys Ser Ala Gln Gly Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Phe Phe  
 80 85 90 95

Lys Pro Gly Gln Glu Ala Val Lys Tyr Gln Gly Pro Arg Asp Phe Glu  
 100 105 110

Thr Leu Glu Asn Trp Met Leu Gln Thr Leu Asn Glu Glu Pro Ala Thr  
 115 120 125

Pro Glu Pro Glu Ala Glu Pro Pro Arg Ala Pro Glu Leu Lys Gln Gly  
 130 135 140

Leu Tyr Glu Leu Ser Ala Asn Asn Phe Glu Leu His Val Ser Gln Gly  
 145 150 155

Asn His Phe Ile Lys Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala  
 160 165 170 175

Leu Ala Pro Thr Trp Glu Gln Leu Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Glu  
 180 185 190

25/51

Thr Val Lys Ile Gly Lys Val Asp Cys Thr Gln His Tyr Ala Val Cys  
195 200 205

Ser Glu His Gln Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Leu Trp Phe Arg Asp  
210 215 220

Gly Lys Lys Val Asp Gln Tyr Lys Gly Lys Arg Asp Leu Glu Ser Leu  
225 230 235

Arg Asp Tyr Val Gln Ser Gln Leu  
240 245

<210> 15  
<211> 1269  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1266)  
<223>

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (1)..(63)  
<223>

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (64)..()  
<223>

<400> 15  
atg cgt gcg gcc cgg tgt gcc gcg gcg ctg ctg ctg ctg cta ctg agc 48  
Met Arg Ala Gly Arg Cys Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser  
-20 -15 -10  
ggc gcg ggg cgc gcg atc gcc tcc gag gac atc gtg gla ggc tgc ggg 96  
Gly Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ser Glu Asp Ile Val Val Gly Cys Gly  
-5 -1 1 5 10  
ggt ttc gtg aag tgc gac gtg gag atc aac tac tgc ctc atc gag ala 144  
Gly Phe Val Lys Ser Asp Val Glu Ile Asn Tyr Ser Leu Ile Glu Ile  
15 20 25  
aag tta tac acc aag cat ggg act ttg aaa tat cag acg gac tgt gct 192  
Lys Leu Tyr Thr Lys His Gly Thr Leu Lys Tyr Gln Thr Asp Cys Ala  
30 35 40  
cct aac aac gcc tac ttt atg atc ccc ttg tat gat aag ggg gat ttc 240  
Pro Asn Asn Gly Tyr Phe Met Ile Pro Leu Tyr Asp Lys Gly Asp Phe  
45 50 55  
atc ctg aag atc gaa cct cct ctg gcc tgg agt ttt gag cca acc aac 288  
Ile Leu Lys Ile Glu Pro Pro Leu Gly Trp Ser Phe Glu Pro Thr Asn  
60 65 70 75  
glg gag ctg cga gtg gal ggt gtg agc gac atc tgc acg aag gcc ggg 336

26/51

Val	Glu	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Val	Ser	Asp	Ile	Cys	Thr	Lys	Gly	Gly		
				80					85					90			
gac	alc	aac	ttc	ctg	ttc	acc	ggc	ttc	tcg	gtg	aat	ggc	aag	gtc	ctc	384	
Asp	Ile	Asn	Phe	Leu	Phe	Thr	Gly	Phe	Ser	Val	Asn	Gly	Lys	Val	Leu		
			95					100					105				
agc	aaa	ggg	cag	ccc	ctg	ggc	cca	gca	gga	ggt	cag	gla	tcc	ctg	aga	432	
Ser	Lys	Gly	Gln	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Val	Ser	Leu	Arg		
		110					115					120					
agc	acc	ggt	gcl	gac	tcg	aag	alc	cag	tcg	aca	gtc	acg	cag	ccg	ggc	480	
Ser	Thr	Gly	Ala	Asp	Ser	Lys	Ile	Gln	Ser	Thr	Val	Thr	Gln	Pro	Gly		
		125				130						135					
gga	aag	ttt	gcg	ttt	ttc	aaa	gtt	ctt	ccg	gga	gat	tat	gaa	atc	ctt	528	
Gly	Lys	Phe	Ala	Phe	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Asp	Tyr	Glu	Ile	Leu			
140					145				150					155			
gca	act	cac	ccg	acc	tgg	gcg	ctg	aag	gag	gca	agt	acc	acg	gtg	cgt	576	
Ala	Thr	His	Pro	Thr	Trp	Ala	Leu	Lys	Glu	Ala	Ser	Thr	Thr	Val	Arg		
				160					165					170			
gtg	acg	aac	tcg	aat	gcl	aac	gca	gcl	ggt	ccc	ctc	ata	gtg	gcl	ggc	624	
Val	Thr	Asn	Ser	Asn	Ala	Asn	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Ile	Val	Ala	Gly		
			175				180						185				
tat	aat	gtg	tcc	ggc	tcg	gtc	cgc	agt	gac	ggg	gag	ccc	atg	aaa	ggg	672	
Tyr	Asn	Val	Ser	Gly	Ser	Val	Arg	Ser	Asp	Gly	Glu	Pro	Met	Lys	Gly		
		190					195					200					
gtg	aag	ttt	ctt	ctc	ttt	tcg	tcg	tta	gtg	aac	aaa	gag	gat	gtc	ctg	720	
Val	Lys	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Ser	Leu	Val	Asn	Lys	Glu	Asp	Val	Leu		
	205					210					215						
ggc	tgc	aat	gtg	tcc	cca	gtg	tcc	ggg	ttc	cag	ccc	cca	gat	gag	agc	768	
Gly	Cys	Asn	Val	Ser	Pro	Val	Ser	Gly	Phe	Gln	Pro	Pro	Asp	Glu	Ser		
220					225					230					235		
ctg	gtt	tat	ctg	tgc	tat	gcg	gtc	tcc	aaa	gaa	gac	ggc	cca	ttt	tcg	816	
Leu	Val	Tyr	Leu	Cys	Tyr	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Asp	Gly	Pro	Phe	Ser		
			240						245					250			
ttc	tat	tcc	tgg	ccg	agt	ggg	ggc	tac	act	gtg	gtg	ccc	ttc	tac	cga	864	
Phe	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gly	Gly	Tyr	Thr	Val	Val	Pro	Phe	Tyr	Arg		
		255					260						265				
gga	gaa	agg	atc	acc	ttc	gac	gtg	gcg	ccc	tcc	cgg	ctt	gac	ttc	acg	912	
Gly	Glu	Arg	Ile	Thr	Phe	Asp	Val	Ala	Pro	Ser	Arg	Leu	Asp	Phe	Thr		
		270				275						280					
gtg	gag	cac	ggc	agc	ctg	aga	alc	gag	ccg	gta	ttc	cac	gtc	atg	ggc	960	
Val	Glu	His	Gly	Ser	Leu	Arg	Ile	Glu	Pro	Val	Phe	His	Val	Met	Gly		
	285				290						295						
ttc	tcg	gtc	acc	ggg	aga	gtc	tgg	aat	gga	ccg	gac	gga	gaa	ggc	gtc	1008	
Phe	Ser	Val	Thr	Gly	Arg	Val	Leu	Asn	Gly	Pro	Asp	Gly	Glu	Gly	Val		
300					305					310					315		
ccg	gag	gcl	gtg	gtc	acc	ctg	aac	aac	cag	all	aaa	gtc	aaa	acg	aag	1056	
Pro	Glu	Ala	Val	Val	Thr	Leu	Asn	Asn	Gln	Ile	Lys	Val	Lys	Thr	Lys		
				320					325						330		



27/51

gcc gac ggc tcc ttc cgc ctg gag aac ata acg aca ggg aca lac acc 1104  
 Ala Asp Gly Ser Phe Arg Leu Glu Asn Ile Thr Thr Gly Thr Tyr Thr  
 335 340 345  
 atc cac gct cag aag gag cac ctg tac ttc gag atg gtc acc atc aaa 1152  
 Ile His Ala Gln Lys Glu His Leu Tyr Phe Glu Met Val Thr Ile Lys  
 350 355 360  
 att gcc ccc aat acc cca cag ctg gct gac ctg atc gct aca ggg ctt 1200  
 Ile Ala Pro Asn Thr Pro Gln Leu Ala Asp Leu Ile Ala Thr Gly Leu  
 365 370 375  
 ctg cct gca ggt tca gca tct gtg gtc aga tgg cca tgg tcc gct ccc 1248  
 Leu Pro Ala Gly Ser Ala Ser Val Val Arg Ser Pro Ser Ser Ala Pro  
 380 385 390 395  
 ccg aca cca tca agc aga tga 1269  
 Pro Thr Pro Ser Ser Arg  
 400

<210> 16  
 <211> 422  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 16

Met Arg Ala Gly Arg Cys Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser  
 -20 -15 -10  
 Gly Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ser Glu Asp Ile Val Val Gly Cys Gly  
 -5 -1 1 5 10  
 Gly Phe Val Lys Ser Asp Val Glu Ile Asn Tyr Ser Leu Ile Glu Ile  
 15 20 25  
 Lys Leu Tyr Thr Lys His Gly Thr Leu Lys Tyr Gln Thr Asp Cys Ala  
 30 35 40  
 Pro Asn Asn Gly Tyr Phe Met Ile Pro Leu Tyr Asp Lys Gly Asp Phe  
 45 50 55  
 Ile Leu Lys Ile Glu Pro Pro Leu Gly Trp Ser Phe Glu Pro Thr Asn  
 60 65 70 75  
 Val Glu Leu Arg Val Asp Gly Val Ser Asp Ile Cys Thr Lys Gly Gly  
 80 85 90  
 Asp Ile Asn Phe Leu Phe Thr Gly Phe Ser Val Asn Gly Lys Val Leu  
 95 100 105  
 Ser Lys Gly Gln Pro Leu Gly Pro Ala Gly Val Gln Val Ser Leu Arg

28/51

110	115	120
Ser Thr Gly Ala Asp Ser Lys Ile Gln Ser Thr Val Thr Gln Pro Gly		
125	130	135
Gly Lys Phe Ala Phe Phe Lys Val Leu Pro Gly Asp Tyr Glu Ile Leu		
140	145	150
Ala Thr His Pro Thr Trp Ala Leu Lys Glu Ala Ser Thr Thr Val Arg		
160	165	170
Val Thr Asn Ser Asn Ala Asn Ala Ala Gly Pro Leu Ile Val Ala Gly		
175	180	185
Tyr Asn Val Ser Gly Ser Val Arg Ser Asp Gly Glu Pro Met Lys Gly		
190	195	200
Val Lys Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu Val Asn Lys Glu Asp Val Leu		
205	210	215
Gly Cys Asn Val Ser Pro Val Ser Gly Phe Gln Pro Pro Asp Glu Ser		
220	225	230
Leu Val Tyr Leu Cys Tyr Ala Val Ser Lys Glu Asp Gly Pro Phe Ser		
240	245	250
Phe Tyr Ser Leu Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Val Val Pro Phe Tyr Arg		
255	260	265
Gly Glu Arg Ile Thr Phe Asp Val Ala Pro Ser Arg Leu Asp Phe Thr		
270	275	280
Val Glu His Gly Ser Leu Arg Ile Glu Pro Val Phe His Val Met Gly		
285	290	295
Phe Ser Val Thr Gly Arg Val Leu Asn Gly Pro Asp Gly Glu Gly Val		
300	305	310
Pro Glu Ala Val Val Thr Leu Asn Asn Gln Ile Lys Val Lys Thr Lys		
320	325	330
Ala Asp Gly Ser Phe Arg Leu Glu Asn Ile Thr Thr Gly Thr Tyr Thr		
335	340	345
Ile His Ala Gln Lys Glu His Leu Tyr Phe Glu Met Val Thr Ile Lys		
350	355	360

29/51

Ile Ala Pro Asn Thr Pro Gln Leu Ala Asp Leu Ile Ala Thr Gly Leu  
 365 370 375

Leu Pro Ala Gly Ser Ala Ser Val Val Arg Ser Pro Ser Ser Ala Pro  
 380 385 390 395

Pro Thr Pro Ser Ser Arg  
 400

<210> 17  
 <211> 531  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(528)  
 <223>

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(81)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (82)..()  
 <223>

<400> 17  
 atg gca gcg agc acg gac ala gcl ggg clg gag gag agc ttc cgg aag 48  
 Met Ala Ala Ser Thr Asp Ile Ala Gly Leu Glu Glu Ser Phe Arg Lys  
 -25 -20 -15  
 ttt gcc atc cat ggc gac ccc aag gcc agc ggg caa gag atg aat ggc 96  
 Phe Ala Ile His Gly Asp Pro Lys Ala Ser Gly Gln Glu Met Asn Gly  
 -10 -5 -1 1 5  
 aag aac tgg gcc aag clg tgc aag gac tgl aag gtg gcc gac gga aag 144  
 Lys Asn Trp Ala Lys Leu Cys Lys Asp Cys Lys Val Ala Asp Gly Lys  
 10 15 20  
 gcc gla acg ggc acc gac glc gac alc glc ttc tcc aaa gtc aag gcg 192  
 Ala Val Thr Gly Thr Asp Val Asp Ile Val Phe Ser Lys Val Lys Ala  
 25 30 35  
 aaa tct gct aga gta atc aac tat gag gag ttc aag aag gcc clg gaa 240  
 Lys Ser Ala Arg Val Ile Asn Tyr Glu Glu Phe Lys Lys Ala Leu Glu  
 40 45 50  
 gag clg gca act aag cgg ttc aag ggg aag tcc aag gag gag gcc ttt 288  
 Glu Leu Ala Thr Lys Arg Phe Lys Gly Lys Ser Lys Glu Glu Ala Phe  
 55 60 65  
 gat gcc atc tgc cag clg ala gcg ggc aag gaa ccg gcc aac att ggc 336  
 Asp Ala Ile Cys Gln Leu Ile Ala Gly Lys Glu Pro Ala Asn Ile Gly  
 70 75 80 85

30/51

glc acc aaa gct aaa acg ggt ggt gct glg gac cgg ctg acg gac acc 384  
 Val Thr Lys Ala Lys Thr Gly Gly Ala Val Asp Arg Leu Thr Asp Thr  
 90 95 100  
 agt aag tat acg ggc tcc cac aaa gaa cgc ttt gat gag agc ggc aag 432  
 Ser Lys Tyr Thr Gly Ser His Lys Glu Arg Phe Asp Glu Ser Gly Lys  
 105 110 115  
 gga aag ggc atc gct gga cgg cag gac atc ctg gac gac agt ggc tac 480  
 Gly Lys Gly Ile Ala Gly Arg Gln Asp Ile Leu Asp Asp Ser Gly Tyr  
 120 125 130  
 glg agt gcc tac aaa aac gca ggc acc tat gac gcc aag gtg aag aag 528  
 Val Ser Ala Tyr Lys Asn Ala Gly Thr Tyr Asp Ala Lys Val Lys Lys  
 135 140 145  
 tga 531

<210> 18  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 18

Met Ala Ala Ser Thr Asp Ile Ala Gly Leu Glu Glu Ser Phe Arg Lys  
-25 -20 -15

Phe Ala Ile His Gly Asp Pro Lys Ala Ser Gly Gln Glu Met Asn Gly  
-10 -5 -1 1 5

Lys Asn Trp Ala Lys Leu Cys Lys Asp Cys Lys Val Ala Asp Gly Lys  
10 15 20

Ala Val Thr Gly Thr Asp Val Asp Ile Val Phe Ser Lys Val Lys Ala  
25 30 35

Lys Ser Ala Arg Val Ile Asn Tyr Glu Glu Phe Lys Lys Ala Leu Glu  
40 45 50

Glu Leu Ala Thr Lys Arg Phe Lys Gly Lys Ser Lys Glu Glu Ala Phe  
55 60 65

Asp Ala Ile Cys Gln Leu Ile Ala Gly Lys Glu Pro Ala Asn Ile Gly  
70 75 80 85

Val Thr Lys Ala Lys Thr Gly Gly Ala Val Asp Arg Leu Thr Asp Thr  
90 95 100

Ser Lys Tyr Thr Gly Ser His Lys Glu Arg Phe Asp Glu Ser Gly Lys  
105 110 115

31/51

Gly Lys Gly Ile Ala Gly Arg Gln Asp Ile Leu Asp Asp Ser Gly Tyr  
 120 125 130

Val Ser Ala Tyr Lys Asn Ala Gly Thr Tyr Asp Ala Lys Val Lys Lys  
 135 140 145

<210> 19  
 <211> 588  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(585)  
 <223>

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(51)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (52)..()  
 <223>

<400> 19  
 atg gct tca gga tgg ttt tac ctg tcc tgc atg gtg ctg gga tgc ctg 48  
 Met Ala Ser Gly Trp Phe Tyr Leu Ser Cys Met Val Leu Gly Ser Leu  
 -15 -10 -5  
 gga tgc atg tgc atc ctc ttc act gcc tac tgg atg cag tac tgg cgc 96  
 Gly Ser Met Cys Ile Leu Phe Thr Ala Tyr Trp Met Gln Tyr Trp Arg  
 -1 1 5 10 15  
 ggt ggc ttt gcc tgg gat ggc acg gtc ctc atg ttt aac tgg cac cca 144  
 Gly Gly Phe Ala Trp Asp Gly Thr Val Leu Met Phe Asn Trp His Pro  
 20 25 30  
 gtg ctc atg gtt gcc ggc atg gtg gtc ctc tat gga gct gcc tca ctg 192  
 Val Leu Met Val Ala Gly Met Val Val Leu Tyr Gly Ala Ala Ser Leu  
 35 40 45  
 gtg tac cgc ctg cct tca tgc tgg gtc ggg ccc agg ctg ccc tgg aaa 240  
 Val Tyr Arg Leu Pro Ser Ser Trp Val Gly Pro Arg Leu Pro Trp Lys  
 50 55 60  
 gtt ctc cat gca gca ctg cac ctg ctg gcc ttc acc tgc act gtg gtg 288  
 Val Leu His Ala Ala Leu His Leu Leu Ala Phe Thr Cys Thr Val Val  
 65 70 75  
 ggg ctg att gcc gtc ttt cgg ttt cac aac cac tgc aga atc gca cac 336  
 Gly Leu Ile Ala Val Phe Arg Phe His Asn His Ser Arg Ile Ala His  
 80 85 90 95  
 ctc tac tcc ctg cac agc tgg ctg ggt atc acc act gta gtc ctc ttc 384  
 Leu Tyr Ser Leu His Ser Trp Leu Gly Ile Thr Thr Val Val Leu Phe  
 100 105 110  
 gcc tgc cag tgg ttc ctg ggc ttt gct gtc ttc ctc ctg ccc tgg gca 432

32/51

Ala Cys Gln Trp Phe Leu Gly Phe Ala Val Phe Leu Leu Pro Trp Ala	
115 120 125	
tcc cag tgg ctg cga agc ctc ctg aaa cct ctg cat gla ttc ttt gga	480
Ser Gln Trp Leu Arg Ser Leu Leu Lys Pro Leu His Val Phe Phe Gly	
130 135 140	
gcc tgc atc ctt tcc ctg tcc atc aca tct gtt att tcc ggc atc aat	528
Ala Cys Ile Leu Ser Leu Ser Ile Thr Ser Val Ile Ser Gly Ile Asn	
145 150 155	
gag aag ctt ttc ttt gtt ttg aaa aat gcc acc aag ccc cta ctc cag	576
Glu Lys Leu Phe Phe Val Leu Lys Asn Ala Thr Lys Pro Leu Leu Gln	
160 165 170 175	
cct gcc tgg tga	588
Pro Ala Trp	

<210> 20  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 20

Met Ala Ser Gly Trp Phe Tyr Leu Ser Cys Met Val Leu Gly Ser Leu
-15 -10 -5

Gly Ser Met Cys Ile Leu Phe Thr Ala Tyr Trp Met Gln Tyr Trp Arg
-1 1 5 10 15

Gly Gly Phe Ala Trp Asp Gly Thr Val Leu Met Phe Asn Trp His Pro
20 25 30

Val Leu Met Val Ala Gly Met Val Val Leu Tyr Gly Ala Ala Ser Leu
35 40 45

Val Tyr Arg Leu Pro Ser Ser Trp Val Gly Pro Arg Leu Pro Trp Lys
50 55 60

Val Leu His Ala Ala Leu His Leu Leu Ala Phe Thr Cys Thr Val Val
65 70 75

Gly Leu Ile Ala Val Phe Arg Phe His Asn His Ser Arg Ile Ala His
80 85 90 95

Leu Tyr Ser Leu His Ser Trp Leu Gly Ile Thr Thr Val Val Leu Phe
100 105 110

Ala Cys Gln Trp Phe Leu Gly Phe Ala Val Phe Leu Leu Pro Trp Ala
115 120 125

33/51

Ser Gln Trp Leu Arg Ser Leu Leu Lys Pro Leu His Val Phe Phe Gly  
 130 135 140

Ala Cys Ile Leu Ser Leu Ser Ile Thr Ser Val Ile Ser Gly Ile Asn  
 145 150 155

Glu Lys Leu Phe Phe Val Leu Lys Asn Ala Thr Lys Pro Leu Leu Gln  
 160 165 170 175

Pro Ala Trp

<210> 21  
 <211> 3147  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(3144)  
 <223>

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(147)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (148)..()  
 <223>

<400> 21  
 atg gag aag aga ctg gga gtc aag cca agt ccc gct tcc tgg gtt ttg 48  
 Met Glu Lys Arg Leu Gly Val Lys Pro Ser Pro Ala Ser Trp Val Leu  
 -45 -40 -35  
 cca gga tat tgt tgg cag aca tca gtg aag ctg ccg aga agc ctg tac 96  
 Pro Gly Tyr Cys Trp Gln Thr Ser Val Lys Leu Pro Arg Ser Leu Tyr  
 -30 -25 -20  
 ctg ctt tac agt ttc ttc tgc ttc agc gtt ctg tgg ttg tca aca gat 144  
 Leu Leu Tyr Ser Phe Phe Cys Phe Ser Val Leu Trp Leu Ser Thr Asp  
 -15 -10 -5  
 gct gat gag agc aga tgc caa cag ggg aag aca ctt tat gga gct ggc 192  
 Ala Asp Glu Ser Arg Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Tyr Gly Ala Gly  
 -1 1 5 10 15  
 ttg aga act gag gga gaa aat cac ctc cgg ctt ctt gca gga agc ctg 240  
 Leu Arg Thr Glu Gly Glu Asn His Leu Arg Leu Leu Ala Gly Ser Leu  
 20 25 30  
 cct ttc cac gcc tgt cgg gct gcc tgc tgc cgg gac tct gcc tgc cac 288  
 Pro Phe His Ala Cys Arg Ala Ala Cys Cys Arg Asp Ser Ala Cys His  
 35 40 45

34/51

gcl cta tgg tgg clg gaa ggg alg tgc ttt cag gcl gac tgc agc aag Ala Leu Trp Trp Leu Glu Gly Met Cys Phe Gln Ala Asp Cys Ser Lys 50 55 60	336
ccc cag agc tgc cag cct ttt agg aca gac tct tcc aat tcc atg clg Pro Gln Ser Cys Gln Pro Phe Arg Thr Asp Ser Ser Asn Ser Met Leu 65 70 75	384
atc att ttt caa aaa tcc caa act aca gal gat ttg ggc ctt clg cct lle lle Phe Gln Lys Ser Gln Thr Thr Asp Asp Leu Gly Leu Leu Pro 80 85 90 95	432
gaa gat gat gaa cca cat ctt clg agg cta ggc tgg ggc agg aca tgc Glu Asp Asp Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Gly Trp Gly Arg Thr Ser 100 105 110	480
tgg agg agg cag agc ctt ctt ggg gcl ccc ctc acc ctt tct gta ccc Trp Arg Arg Gln Ser Leu Leu Gly Ala Pro Leu Thr Leu Ser Val Pro 115 120 125	528
tct agt cac cac cag agc tta ctc agg gat cgg cag aag aga gat ctc Ser Ser His His Gln Ser Leu Leu Arg Asp Arg Gln Lys Arg Asp Leu 130 135 140	576
agt glg gla cct aca cat gga gcg alg cag cat tct aaa gtg aat cac Ser Val Val Pro Thr His Gly Ala Met Gln His Ser Lys Val Asn His 145 150 155	624
tcc gag gaa gca ggt gcl clg agt ccc acc tct gca gag gtc cgc aaa Ser Glu Glu Ala Gly Ala Leu Ser Pro Thr Ser Ala Glu Val Arg Lys 160 165 170 175	672
acc att aca gtt gcc ggt tcc ttc acc agt aac cac act aca cag act Thr lle Thr Val Ala Gly Ser Phe Thr Ser Asn His Thr Thr Gln Thr 180 185 190	720
cct gag tgg ccc aag aat gtg tcc atc cat cct gaa cca tcc gag cac Pro Glu Trp Pro Lys Asn Val Ser lle His Pro Glu Pro Ser Glu His 195 200 205	768
tcc agt cct gla tct ggt act ccg caa gla aaa agc act gag cac agt Ser Ser Pro Val Ser Gly Thr Pro Gln Val Lys Ser Thr Glu His Ser 210 215 220	816
cca act gat gcc cct clg cca glg gcc ccc tcc tac agc tat gcc acc Pro Thr Asp Ala Pro Leu Pro Val Ala Pro Ser Tyr Ser Tyr Ala Thr 225 230 235	864
ccc acg ccc cag gcc tct tct cag agc acc tca gca cca cac cca gtt Pro Thr Pro Gln Ala Ser Ser Gln Ser Thr Ser Ala Pro His Pro Val 240 245 250 255	912
gla aag gag clg glg glg tct gct ggg aag agc gtc cag atc acc clg Val Lys Glu Leu Val Val Ser Ala Gly Lys Ser Val Gln lle Thr Leu 260 265 270	960
cct aag aat gaa gtt cag tta aat gcc ttc gtc ctt cca gaa gca gag Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Phe Val Leu Pro Glu Ala Glu 275 280 285	1008
cca gga gaa acc tac acc tac gac tgg cag clg atc act cat cct aca Pro Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu lle Thr His Pro Thr	1056



35/51

290	295	300	
gac tac agt gga gag glg gag agg aaa cal tcc cag agc ctc caa ctg Asp Tyr Ser Gly Glu Val Glu Arg Lys His Ser Gln Ser Leu Gln Leu 305 310 315			1104
lcc aag ctg act cca ggc ctg tac gaa ttc aag gtg act glg gat ggc Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Thr Val Asp Gly 320 325 330 335			1152
cag aat gcc cat ggg gaa ggc tac gtg aat gtg aca glg aaa cca gag Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys Pro Glu 340 345 350			1200
ccc cgt aag aac cgg cct ccc gtt gct glg gtg tca cct cag ttc cag Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Val Ala Val Val Ser Pro Gln Phe Gln 355 360 365			1248
gag atc lcg ctg cca acc act tct acc atc att gat ggc agc cag agc Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Ile Ile Asp Gly Ser Gln Ser 370 375 380			1296
acg gat gac gat aaa att glc cag tac cac tgg gaa gag ctt aag ggg Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu Lys Gly 385 390 395			1344
ccc ctg aga gaa gag aag atc tct gaa gac aca gcc ala cta aaa ctt Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu Lys Leu 400 405 410 415			1392
agt aag ctc glc cgg ggg aac tac acc ttc agc tta act gtt glc gac Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val Val Asp 420 425 430			1440
tct gac ggg gct acc aac tcc acc act gca agc ctg act gtg aac aaa Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Ser Leu Thr Val Asn Lys 435 440 445			1488
gct gtg gac tac cct ccc glg gcc aat gca ggc ccc aac caa gig atc Ala Val Asp Tyr Pro Pro Val Ala Asn Ala Gly Pro Asn Gln Val Ile 450 455 460			1536
acc ctg cct cag aac tcc atc acc ctc ttt gga aac cag agc acg gat Thr Leu Pro Gln Asn Ser Ile Thr Leu Phe Gly Asn Gln Ser Thr Asp 465 470 475			1584
gac cac ggc atc acc agc tat gag tgg tgc ctc agc ccg agc agc aaa Asp His Gly Ile Thr Ser Tyr Glu Trp Ser Leu Ser Pro Ser Ser Lys 480 485 490 495			1632
ggg aag gtg glg gag atg cag gga gtt aga acg cca gcc ctg cag ctg Gly Lys Val Val Glu Met Gln Gly Val Arg Thr Pro Ala Leu Gln Leu 500 505 510			1680
lcc gca atg caa gaa gga gac tat acc tac cag ctc aca gig act gac Ser Ala Met Gln Glu Gly Asp Tyr Thr Tyr Gln Leu Thr Val Thr Asp 515 520 525			1728
acc gca gga caa cag gcc acc gcc caa gtg act gtg att gtg cag cct Thr Ala Gly Gln Gln Ala Thr Ala Gln Val Thr Val Ile Val Gln Pro 530 535 540			1776

36/51

gag aac aac aag cct cct cag gca gal gca ggc cca gac aaa gag cag	1824
Glu Asn Asn Lys Pro Pro Gln Ala Asp Ala Gly Pro Asp Lys Glu Leu	
545 550 555	
acc cag ccc glg gac agc aca acc cag gac ggc agc aag agc aca gat	1872
Thr Leu Pro Val Asp Ser Thr Thr Leu Asp Gly Ser Lys Ser Thr Asp	
560 565 570 575	
gac cag aga glc glc tct tac ctt tgg gag cag agt cgg gga cct gac	1920
Asp Gln Arg Val Val Ser Tyr Leu Trp Glu Gln Ser Arg Gly Pro Asp	
580 585 590	
ggg glg cag cag gag aat gcc aac agc agt gtc gcc act glg act ggg	1968
Gly Val Gln Val Glu Asn Ala Asn Ser Ser Val Ala Thr Val Thr Gly	
595 600 605	
cag caa glc ggg act tat gta ttc acc ttg act gtc aaa gat gag agg	2016
Leu Gln Val Gly Thr Tyr Val Phe Thr Leu Thr Val Lys Asp Glu Arg	
610 615 620	
aac cta cag agc cag agc tcc gtt aat gtc att gtc aaa gaa gaa ata	2064
Asn Leu Gln Ser Gln Ser Ser Val Asn Val Ile Val Lys Glu Glu Ile	
625 630 635	
aac aaa ccg cca gla gcc aag atc gct ggg aac glg glg glg acc ttg	2112
Asn Lys Pro Pro Val Ala Lys Ile Ala Gly Asn Val Val Val Thr Leu	
640 645 650 655	
ccc acg agc aca gct gag ctg gat ggc lcg agg tcc tca gat gac aag	2160
Pro Thr Ser Thr Ala Glu Leu Asp Gly Ser Arg Ser Ser Asp Asp Lys	
660 665 670	
ggg ala glc agc tac ctg tgg act cga gal gag acg agc cca gcc gca	2208
Gly Ile Val Ser Tyr Leu Trp Thr Arg Asp Glu Thr Ser Pro Ala Ala	
675 680 685	
ggg gag glg ctg aat cac tct gac cac cac cct gtc ctc ttc ctc tcc	2256
Gly Glu Val Leu Asn His Ser Asp His His Pro Val Leu Phe Leu Ser	
690 695 700	
aac cag glg gag ggg acc tac acg ttt cac ctg aaa gtg aca gat gca	2304
Asn Leu Val Glu Gly Thr Tyr Thr Phe His Leu Lys Val Thr Asp Ala	
705 710 715	
aag ggc gag agc gac aca gac cgg acg aca glg gaa glg aag cct gac	2352
Lys Gly Glu Ser Asp Thr Asp Arg Thr Thr Val Glu Val Lys Pro Asp	
720 725 730 735	
ccc agg aaa agc aac cta glg gag atc atc ttg gat glg aac gtc agt	2400
Pro Arg Lys Ser Asn Leu Val Glu Ile Ile Leu Asp Val Asn Val Ser	
740 745 750	
cag ctg act gag agg ctg aag ggg atg ctc atc cgc cag att ggg gtc	2448
Gln Leu Thr Glu Arg Leu Lys Gly Met Leu Ile Arg Gln Ile Gly Val	
755 760 765	
ctc ctg ggg glg ctg gat tcc gac atc att glg caa aag att cag ccg	2496
Leu Leu Val Val Leu Asp Ser Asp Ile Ile Val Gln Lys Ile Gln Pro	
770 775 780	
tac acg gag cag agc acc aag atg ttg ttt ttt gtt cag aac gac cct	2544
Tyr Thr Glu Gln Ser Thr Lys Met Leu Phe Phe Val Gln Asn Asp Pro	

37/51

785	790	795	
ccc cac cag ctc ttc aaa ggc cat gag gtg gca gcc atg ctc aag agc Pro His Gln Leu Phe Lys Gly His Glu Val Ala Ala Met Leu Lys Ser 800 805 810 815			2592
gag ctg cag aag cag aag gct gac ttc ctc atc ttc aga gcc ctg gaa Glu Leu Gln Lys Gln Lys Ala Asp Phe Leu Ile Phe Arg Ala Leu Glu 820 825 830			2640
atc agc aca gtc aca tgt cag ctg aac tgt tct gac cat ggc cac tgt Ile Ser Thr Val Thr Cys Gln Leu Asn Cys Ser Asp His Gly His Cys 835 840 845			2688
gac tca ttc acc aag cgc tgt gtc tgt gac ccg ttt tgg atg gag aat Asp Ser Phe Thr Lys Arg Cys Val Cys Asp Pro Phe Trp Met Glu Asn 850 855 860			2736
ttc atc aag gtg cag ctg agg gat gga gac agc aac tgt gaa tgg agc Phe Ile Lys Val Gln Leu Arg Asp Gly Asp Ser Asn Cys Glu Trp Ser 865 870 875			2784
gtg ctc tac gtc atc att gcc tcc ttt gtc att gtt gtt gcc ttg ggg Val Leu Tyr Val Ile Ile Ala Ser Phe Val Ile Val Val Ala Leu Gly 880 885 890 895			2832
atc ctg tca tgg act aca atc tgc tgc tgc aag agg caa aaa gga aaa Ile Leu Ser Trp Thr Thr Ile Cys Cys Cys Lys Arg Gln Lys Gly Lys 900 905 910			2880
ccc aag agg aaa agc aga tac aag atc ctg gat gcc aca gat cag gag Pro Lys Arg Lys Ser Arg Tyr Lys Ile Leu Asp Ala Thr Asp Gln Glu 915 920 925			2928
agc ctg gag ctg aaa cca acc tcc cga gca ggc agc aaa cag aaa ggc Ser Leu Glu Leu Lys Pro Thr Ser Arg Ala Gly Ser Lys Gln Lys Gly 930 935 940			2976
ccc acg ctg agc agc agc ctg atg cat tct gaa tcg gag ctg gac agc Pro Thr Leu Ser Ser Ser Leu Met His Ser Glu Ser Glu Leu Asp Ser 945 950 955			3024
gac gat gcc atc ttc aca tgg cca gac cgg gag aag ggc aaa cta ctg Asp Asp Ala Ile Phe Thr Trp Pro Asp Arg Glu Lys Gly Lys Leu Leu 960 965 970 975			3072
tat ggt cag aat ggc tct gtg cca aac ggg caa aca cct ttg aag tcc Tyr Gly Gln Asn Gly Ser Val Pro Asn Gly Gln Thr Pro Leu Lys Ser 980 985 990			3120
agg agc gca cgg gag gag atc ttg tag Arg Ser Ala Arg Glu Glu Ile Leu 995			3147

<210> 22  
 <211> 1048  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 22

38/51

Met Glu Lys Arg Leu Gly Val Lys Pro Ser Pro Ala Ser Trp Val Leu  
 -45 -40 -35

Pro Gly Tyr Cys Trp Gln Thr Ser Val Lys Leu Pro Arg Ser Leu Tyr  
 -30 -25 -20

Leu Leu Tyr Ser Phe Phe Cys Phe Ser Val Leu Trp Leu Ser Thr Asp  
 -15 -10 -5

Ala Asp Glu Ser Arg Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Tyr Gly Ala Gly  
 -1 1 5 10 15

Leu Arg Thr Glu Gly Glu Asn His Leu Arg Leu Leu Ala Gly Ser Leu  
 20 25 30

Pro Phe His Ala Cys Arg Ala Ala Cys Cys Arg Asp Ser Ala Cys His  
 35 40 45

Ala Leu Trp Trp Leu Glu Gly Met Cys Phe Gln Ala Asp Cys Ser Lys  
 50 55 60

Pro Gln Ser Cys Gln Pro Phe Arg Thr Asp Ser Ser Asn Ser Met Leu  
 65 70 75

Ile Ile Phe Gln Lys Ser Gln Thr Thr Asp Asp Leu Gly Leu Leu Pro  
 80 85 90 95

Glu Asp Asp Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Gly Trp Gly Arg Thr Ser  
 100 105 110

Trp Arg Arg Gln Ser Leu Leu Gly Ala Pro Leu Thr Leu Ser Val Pro  
 115 120 125

Ser Ser His His Gln Ser Leu Leu Arg Asp Arg Gln Lys Arg Asp Leu  
 130 135 140

Ser Val Val Pro Thr His Gly Ala Met Gln His Ser Lys Val Asn His  
 145 150 155

Ser Glu Glu Ala Gly Ala Leu Ser Pro Thr Ser Ala Glu Val Arg Lys  
 160 165 170 175

Thr Ile Thr Val Ala Gly Ser Phe Thr Ser Asn His Thr Thr Gln Thr  
 180 185 190

Pro Glu Trp Pro Lys Asn Val Ser Ile His Pro Glu Pro Ser Glu His  
 195 200 205

39/51

Ser Ser Pro Val Ser Gly Thr Pro Gln Val Lys Ser Thr Glu His Ser  
 210 215 220  
 Pro Thr Asp Ala Pro Leu Pro Val Ala Pro Ser Tyr Ser Tyr Ala Thr  
 225 230 235  
 Pro Thr Pro Gln Ala Ser Ser Gln Ser Thr Ser Ala Pro His Pro Val  
 240 245 250 255  
 Val Lys Glu Leu Val Val Ser Ala Gly Lys Ser Val Gln Ile Thr Leu  
 260 265 270  
 Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Phe Val Leu Pro Glu Ala Glu  
 275 280 285  
 Pro Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His Pro Thr  
 290 295 300  
 Asp Tyr Ser Gly Glu Val Glu Arg Lys His Ser Gln Ser Leu Gln Leu  
 305 310 315  
 Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Thr Val Asp Gly  
 320 325 330 335  
 Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys Pro Glu  
 340 345 350  
 Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Val Ala Val Val Ser Pro Gln Phe Gln  
 355 360 365  
 Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Ile Ile Asp Gly Ser Gln Ser  
 370 375 380  
 Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu Lys Gly  
 385 390 395  
 Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu Lys Leu  
 400 405 410 415  
 Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val Val Asp  
 420 425 430  
 Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Ser Leu Thr Val Asn Lys  
 435 440 445

40/51

Ala Val Asp Tyr Pro Pro Val Ala Asn Ala Gly Pro Asn Gln Val Ile  
 450 455 460

Thr Leu Pro Gln Asn Ser Ile Thr Leu Phe Gly Asn Gln Ser Thr Asp  
 465 470 475

Asp His Gly Ile Thr Ser Tyr Glu Trp Ser Leu Ser Pro Ser Ser Lys  
 480 485 490 495

Gly Lys Val Val Glu Met Gln Gly Val Arg Thr Pro Ala Leu Gln Leu  
 500 505 510

Ser Ala Met Gln Glu Gly Asp Tyr Thr Tyr Gln Leu Thr Val Thr Asp  
 515 520 525

Thr Ala Gly Gln Gln Ala Thr Ala Gln Val Thr Val Ile Val Gln Pro  
 530 535 540

Glu Asn Asn Lys Pro Pro Gln Ala Asp Ala Gly Pro Asp Lys Glu Leu  
 545 550 555

Thr Leu Pro Val Asp Ser Thr Thr Leu Asp Gly Ser Lys Ser Thr Asp  
 560 565 570 575

Asp Gln Arg Val Val Ser Tyr Leu Trp Glu Gln Ser Arg Gly Pro Asp  
 580 585 590

Gly Val Gln Leu Glu Asn Ala Asn Ser Ser Val Ala Thr Val Thr Gly  
 595 600 605

Leu Gln Val Gly Thr Tyr Val Phe Thr Leu Thr Val Lys Asp Glu Arg  
 610 615 620

Asn Leu Gln Ser Gln Ser Ser Val Asn Val Ile Val Lys Glu Glu Ile  
 625 630 635

Asn Lys Pro Pro Val Ala Lys Ile Ala Gly Asn Val Val Val Thr Leu  
 640 645 650 655

Pro Thr Ser Thr Ala Glu Leu Asp Gly Ser Arg Ser Ser Asp Asp Lys  
 660 665 670

Gly Ile Val Ser Tyr Leu Trp Thr Arg Asp Glu Thr Ser Pro Ala Ala  
 675 680 685

Gly Glu Val Leu Asn His Ser Asp His His Pro Val Leu Phe Leu Ser  
 690 695 700

41/51

Asn Leu Val Glu Gly Thr Tyr Thr Phe His Leu Lys Val Thr Asp Ala  
 705 710 715  
 Lys Gly Glu Ser Asp Thr Asp Arg Thr Thr Val Glu Val Lys Pro Asp  
 720 725 730 735  
 Pro Arg Lys Ser Asn Leu Val Glu Ile Ile Leu Asp Val Asn Val Ser  
 740 745 750  
 Gln Leu Thr Glu Arg Leu Lys Gly Met Leu Ile Arg Gln Ile Gly Val  
 755 760 765  
 Leu Leu Gly Val Leu Asp Ser Asp Ile Ile Val Gln Lys Ile Gln Pro  
 770 775 780  
 Tyr Thr Glu Gln Ser Thr Lys Met Leu Phe Phe Val Gln Asn Asp Pro  
 785 790 795  
 Pro His Gln Leu Phe Lys Gly His Glu Val Ala Ala Met Leu Lys Ser  
 800 805 810 815  
 Glu Leu Gln Lys Gln Lys Ala Asp Phe Leu Ile Phe Arg Ala Leu Glu  
 820 825 830  
 Ile Ser Thr Val Thr Cys Gln Leu Asn Cys Ser Asp His Gly His Cys  
 835 840 845  
 Asp Ser Phe Thr Lys Arg Cys Val Cys Asp Pro Phe Trp Met Glu Asn  
 850 855 860  
 Phe Ile Lys Val Gln Leu Arg Asp Gly Asp Ser Asn Cys Glu Trp Ser  
 865 870 875  
 Val Leu Tyr Val Ile Ile Ala Ser Phe Val Ile Val Val Ala Leu Gly  
 880 885 890 895  
 Ile Leu Ser Trp Thr Thr Ile Cys Cys Cys Lys Arg Gln Lys Gly Lys  
 900 905 910  
 Pro Lys Arg Lys Ser Arg Tyr Lys Ile Leu Asp Ala Thr Asp Gln Glu  
 915 920 925  
 Ser Leu Glu Leu Lys Pro Thr Ser Arg Ala Gly Ser Lys Gln Lys Gly  
 930 935 940

42/51

Pro Thr Leu Ser Ser Ser Leu Met His Ser Glu Ser Glu Leu Asp Ser  
 945 950 955

Asp Asp Ala Ile Phe Thr Trp Pro Asp Arg Glu Lys Gly Lys Leu Leu  
 960 965 970 975

Tyr Gly Gln Asn Gly Ser Val Pro Asn Gly Gln Thr Pro Leu Lys Ser  
 980 985 990

Arg Ser Ala Arg Glu Glu Ile Leu  
 995

<210> 23  
 <211> 691  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (633)..(633)  
 <223> 'n' stands for unidentified base.

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (680)..(680)  
 <223> 'n' stands for unidentified base.

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (682)..(682)  
 <223> 'n' stands for unidentified base.

<400> 23  
 ccggcgiccg gcagatgcac gcggggcggg ggccggggga gaggcgggga gagagaaccc 60  
 acaacaaaac ttggctcgct gcgcccacgg ctgcactlga atgacaggag ccggcgcccc 120  
 cggagcgcag cggacacccg cgagcctgtt ccgcccacgg cgcggcgcg c agcggcagg 180  
 gctggcaagg gccagtgga tcatatccc cagagcggg gtlacaggtg gttgtgagtc 240  
 atcccagaga gtgcgggct cagcttctg tgagcagagc actgctctta acagataagc 300  
 ttgtggactt ttatggagac aagccaaagg tgagagaaga aagccagcct gtccagcacc 360  
 atggcggga gcaggggctt gccacttcta ctgcgggag ttacagctct cctggggcct 420  
 gtgcgctgt tgagggcacc tglgtllggc cgaagtgaca cccccaccc gagccccgag 480  
 gagaatgaat ttgtggagga agagaalcag ccagtcgagg ttctgagctc cgaggagcca 540  
 gagcctggcc agccactgic gactgcccc agattgggag ctgtccagg aagggtatg 600  
 gactgtggg gcattgacct gcgtgagttt canggggaact gccgagcaca ccaaccaict 660



43/51

tcctctgcag aaaaaccagn tngagaaaat c 691

<210> 24  
 <211> 572  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 24  
 gctgctgca ggtggctccct tttatggagg gtccctgagg tcgctgcgca gcggctggcc 60  
 gactlccgca gcgggtctcg ggccaccgag cgcctgtctc acccagcgcc atggctgagg 120  
 ccgctgtcgg ccgcccagaga gccctgcgct gcccgctgtt gctccctgtc tcactctcgc 180  
 tggtagccgg ccttgcgctg ggctggaaac accctgacag aatactcttg cgggatgiga 240  
 aagctcttac cctctactcc gacccttaca ccacctcccg gaggtcggac cctatccac 300  
 agttagagtg tgttggaggc accgcccgtt gtgaggccia taccctcagg gtgatacagt 360  
 gccagaacaa aggtcgggat ggctacgatg tacagtggga atglaagacc gacttggata 420  
 ttgcatacaa atttggcaaa actgtgttga gctgtgaagg ctacgagtc tctgaagacc 480  
 agtatgtcct caggggttcc tgcggcttgg agtacaactt agattacaca gagctggggc 540  
 tgaagaaact gaaggagcgc ggccgcgtcg ac 572

<210> 25  
 <211> 877  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc feature  
 <222> (662)..(662)  
 <223> 'n' stands for unidentified base.

<400> 25  
 ctccgcccga gtctcggg ggctgccggg cagccctccc gccatgcacc tgcctgttc 60  
 agccgcgttc gggctgtcgc tgcctgtgcc gccgcccggg gccglagctt cccggaagcc 120  
 gacgatgtgc cagagatgcc ggacgtcgtt ggacaagttc aaccagggga tggccaacac 180  
 ggccaggaag aatttcggtg cgggcaacac ggctgtggaa gagaagacgc tgtctaagta 240  
 cgaattcagt gagatccgc tcttgagat catggagggt ctgtgtgaca gcagtgcatt 300  
 tgagtgaac caactcttgg agcagcagga ggagcagcta gaggttgggt ggcagacact 360  
 gaagaaggag caccccaacc taattgagtg gtctgtgtga cacacactga aagcgtgtc 420  
 tcttccaggc acctacgggc cagactgtca agagtccag ggtgggtccg agaggccttg 480  
 cagcggaaac ggctattgca gcggagacgg cagcagacag ggcgacgggt cctgccagtg 540  
 tcacacaggc tacaaggac cactgtgtat tgactgcaca gacggcttct tcagcttgca 600

44/51

gaggaacgag acccacagca tctgctcagc cigtgaltgag tcttgcaaga cctgctctgg 660  
 tncagcaac aaagactgta tccagtgtga agtgggctgg gcacgtgtgg aggaigcctg 720  
 tgtggatgtg gattgagtg cagcagagac atctccgtgc agcgaigggc agtactgtga 780  
 gaalgtaac ggctcgtaca catgtgaaga cigtgaltct acctgcgtgg gctgtacagg 840  
 aaaaggccca gccaacgtga aggagtgtat tgcctggc 877

<210> 26  
 <211> 930  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 26  
 aggggacccg cggcagcagc gagagctcgc cagccccgcc acgaigcccc cgcgcccagg 60  
 acgccctctc cagccgtctg cgggctgccc ggcccctggc acgtctctgc tctgctctgg 120  
 ggcgcgcaaa ggcgcccggg cccaggaggt ggaagcggac agcggggctc agcaggaccc 180  
 gcacgccaag cactgtata cggccgacat gttcacgcac gggatccaga gcgccgcgca 240  
 ctctgtcatg tctctcgcgc cctgggtgtg acactgccag cggctgcagc caacttggaa 300  
 tgacctggga gacaagtaca acagatgga ggaigccaag gcttactgtg ccaaagtggg 360  
 ctgcacggct gattccgacg tctgctctgc ccagggtgtg caggatacc ccacctgaa 420  
 gtlllllaag cctggacaag aagcagtgaa gtaccagggt cctagagact ttgaaacact 480  
 ggaaaactgg atgtctcaga cactgaacga ggagccagcc acaccggagc cggaagcgga 540  
 accaccaga gccctgagc tcaaacaggg gtgtgtatgag ctctcggcca acaacttga 600  
 gctgcatgtt tctcaaggca accactttat caagttcttc gctccgtgtt gcggtcacig 660  
 caaagctctg gctccaacct gggagcagct ggctctgggc ctigaacatt ctgaaaccgt 720  
 caagattggc aaggltgact gcacgcagca ctacgtctgc tctcagagc atcaggtcag 780  
 aggtatcca actctgtctt ggttctgaga tggcaagaag gtggatcagt acaagggaaa 840  
 gcgggacttg gactcactga gagactatgt gcagtcctag ctgcagggtt cagaggcagc 900  
 tccggagact gttagccgt cagaggcccc 930

<210> 27  
 <211> 641  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (325)..(325)  
 <223> 'n' stands for unidentified base.

<220>

45/51

<221> misc\_feature  
 <222> (329)..(329)  
 <223> 'n' stands for unidentified base.

<400> 27  
 agggcgggga ccgggcgggt tgcggagggt aggcacgcgg aggccggggc atgcgigcgg 60  
 gccggiglgc cgcggcgclg clgcigclgc tclgagcgg cgcggggcgc gcgalcggcl 120  
 ccgaggacal cgtggtaggc tgcgggggtt tclgaagtc ggacgtaggag atcaaclact 180  
 cgcicacga gataaagtta tacaccaagc atgggacitl gaaatalcag acggactlg 240  
 clcctaaca cggclacitl atgacccct tglalgaata gggggatitc atccigaaga 300  
 tgaacctcc tctggcclgg agtlniganc caaccaacgt gtagcigcga gtagatggg 360  
 tagcgacal clgcacgaag ggcggggaca tcaacitctt atcacatggc ttciclig 420  
 atggcaaggi cclcagaaa ggcagcccc lggcccagc aggagticag gtaicccga 480  
 gaagcaccgg tgcgacatc aagatccagt clacagcac gcagccatggc ggaagatlg 540  
 cgtlilcca agticttctt ggagattalg aaatccitgc aacacaccg acctggggcc 600  
 lgaaggaggc aagtaaccag gtcgclgla cgaacigaa t 641

<210> 28  
 <211> 703  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 28  
 gcgcgicgcg gacccccgc lggccitcca gtaggacagc ctccclgggg gctitggcag 60  
 gtlcactitc tlcacctlgg cglcataggt gccatcgltt ttgtaggcac tlcagtagcc 120  
 actgtctlec aggatgtctt gccgtccagc gatgccctt ccttggccgc tclcatcaaa 180  
 gcgtlctitg lgggagcccc tatacttact gggtlccgtc agccggitcca cagcaccacc 240  
 cgtltagct ttggtgacgc caatgtlggc cgtlcttgg cccgclatca gclggcagat 300  
 ggcatcaaag gccctctctt tggacttccc ctigaaccgc ttatgtgcca gctcttccag 360  
 ggcttctitg aactcttcat agltgattac tclagcagat ttcgcltga cttlggagaa 420  
 gacgatgicg acgtcggigc ccgttacggc cltccgtcgc gccaccttac agtcttgc 480  
 cagcttggcc cagltcttgc calcatclc ttgcccgclg gccitgggt cgcaatggat 540  
 ggcaaatitc cggaagctct cctccagccc agclatgtcc gtcicgclg ccatgccacc 600  
 cggcttctac cgttggcgt cctcagcgt tgccttggga caggaccag gaactatgc 660  
 lggagaccag gaggtccac agtccgcic cclgccggcl ccc 703

<210> 29  
 <211> 934

46/51

<212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (605)..(605)  
 <223> 'n' stands for unidentified base.

<400> 29  
 ccgagggtca agaggagcct agggaglggc agcctctgcl gaccggcggg tcccagagac 60  
 clgcccccaa ggtglccac lglglggcta agggiggat agaaccggg clgggagagc 120  
 cgggltatgg gttccaglgg lggtlccgcc gcttccctgc ttcgctctgl ctaccctgg 180  
 cgltcagcct attttcttc glaagaatlg gacattttc cgtgccccll ccataccgca 240  
 ggtgggtgtc gtagaggctc tcacgctlll caaaaggcgl ctcalclaag actlgctaga 300  
 accaacciga claaaggagi caccgtcala cccccctgc acctggagia aalcigactg 360  
 tccgaaggac gaaggaccgg tclglgagca ctlggtctaa ggltggactll attcacactc 420  
 clgagtgga laltatttgt cactcacicc lgaglcctgc cglltggagg ggtgctctll 480  
 ggaaatgagl tclgggaact gaacacagga actgggtgcc tglaccaggc ttgccattlg 540  
 cclgaccgag ttactcttcl ttggatccc gcgclgcagt actttlgaal tglctctlg 600  
 aaggncagaa gtaggtatll ggltccctlgg agctgtgagc lcatglaggl gclgggaact 660  
 cagctlggtl gtlcglcaag accaaggacg agctgtgagc lgltaagigt tttcttcagg 720  
 glgctcagac ggtgaaaatc agagatcagg ccaccttctl gtagacctlc agctgagict 780  
 aaagggtlla ttgalcagaa lggcttcagg atggtttlac clgtcttgca tgggtcggg 840  
 atcgctggga tcatgtgca tctcttcac tgcctacgg atgcagtlact ggcgcggtgg 900  
 ctltgcttgg gatggcacgg lgcclatgll taac 934

<210> 30  
 <211> 812  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (589)..(589)  
 <223> 'n' stands for unidentified base.

<400> 30  
 ggaggctgag gcaagaggga gctgtccggg tggggagcca gcacttctll ctltctcttc 60  
 tgcgtgaggg gagagaaggt tgggggtccc cgagcccatg gatcgggagg aggcggaggc 120  
 cgccgagagc cggcaccctt ctatgtggcc clgagccccg lgtactggll ccgctctct 180  
 ggaaggccat ggagaagaga clgggagica agccaaglc cgcttccctgg gttltgccag 240

47/51

```

galatllgllg gcagacatca gigaagctgc cgagaagccl glacctgccl tacaglttcl 300
lclgttccag cgtlctgigg ttgcaacag atgctgatga gagcagatgc caacagggga 360
agacacttta tggagctggc ttgagaactg agggagaaaa tcacctccgg cltcltgag 420
gaagcctgcc ttccacgcc tgcgggctg cctgctgccg ggactctgcc tgcacgcic 480
talggiggcl ggaagggaig tgccltcagg ctgactgcag taagccccag agctgccagc 540
cctttaggac agactcttcc aatlcacatgc lgalcatlll lcaaaaatnc caaactacag 600
atgattlggg ccttctgccl gaagatgag aaccacatcl tclgaggcta ggclggggca 660
ggacatcgtg gaggaggcag agccttcttg gggctccctt cacccttctt glaccctcta 720
gtcaccacca gagcttacic agggatcggc agaagagaga tclcagtiglg glacctacac 780
atggagcgat gcagcatlcl aaagigaalc ac 812

```

<210> 31  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying cDNA  
 fragment of secretory or membrane proteins derived from mouse white  
 adipose tissue.

<400> 31  
 gggggtagac calcctcta 19

<210> 32  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying cDNA  
 fragment of secretory or membrane proteins derived from mouse white  
 adipose tissue.

<400> 32  
 cgcgagctg taaacggtag 20

<210> 33  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide designed to act as 5'-RACE gene-specific primer  
 for identifying base sequence encoding full length mSST20-14.

<400> 33  
 caggccccig ctgccagcca t 21

48/51

<210> 34  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 3'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST20-14.

<400> 34  
atgcacgcgg ggctgggggcc 20

<210> 35  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 5'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST22-22.

<400> 35  
gcgaccacag gaaccacca t 21

<210> 36  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 3'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST22-22.

<400> 36  
atggtaggtt cctgtgtcg 20

<210> 37  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 5'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST8-5.

<400> 37  
ggctgcaagc agcaggtgca t 21

<210> 38  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 3'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST8-5.

49/51

<400> 38  
algcacctgc tgcctgcagc 20

<210> 39  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 5'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST19-15.

<400> 39  
gcgtccctggg cgcgggggca t 21

<210> 40  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 3'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST19-15.

<400> 40  
algccccgc gccaggacg 20

<210> 41  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 5'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST13-11.

<400> 41  
ggcacaccgg cccgcacgca t 21

<210> 42  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 3'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST13-11.

<400> 42  
atgcgtgcgg gccggtgtgc 20

<210> 43  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

50/51

<223> Oligonucleotide designed to act as 5'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST9-8.

<400> 43  
taatccgtg ctgcctgcca t 21

<210> 44  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 3'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST9-8.

<400> 44  
atgtccctgcc gtccagcgat 20

<210> 45  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 5'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST21-3.

<400> 45  
gtaaaaccat cctgaagcca t 21

<210> 46  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 3'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST21-3.

<400> 46  
atgggttcca gtggtgttc 20

<210> 47  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as 5'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST20-6.

<400> 47  
gactcccagt cctcttcca t 21

<210> 48  
<211> 20  
<212> DNA



51/51

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as 3'-RACE gene-specific primer  
for identifying base sequence encoding full length mSST20-6.

<400> 48

alggatcggg aggaggcgga

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08690

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, A61K38/17,  
39/395, 45/00, 48/00, A61P48/00, 3/04, 3/10, 9/10, 43/00,  
G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, A61K38/17,  
39/395, 45/00, 48/00, A61P48/00, 3/04, 3/10, 9/10, 43/00,  
G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS), Genbank/Geneseq, Swissprot/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kazuhisa MAEDA et al., Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue, Gene, Vol.190 (1997), pages 227 to 235	1-65
Y	Erding Hu et al., AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity, Journal of Biological Chemistry, Vol.271, No.18, (1996), pages 10697 to 10703	1-65
Y	Sylvain Baulande et al., Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage, Journal of Biological Chemistry, Vol.276, No.36, (2001), pages 33336 to 33344	1-65

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 September, 2003 (19.09.03)

Date of mailing of the international search report  
07 October, 2003 (07.10.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08690

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kee-Hong Kim et al., A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation, Journal of Biological Chemistry, Vol.276, No.14, (2001), pages 11252 to 11256	1-65
P,X	US 2003/032155 A1 (Genentech Inc.), 13 February, 2003 (13.02.03), (Family: none)	1-8, 45-65
X	WO 00/53758 A2 (Genentech Inc.), 14 September, 2000 (14.09.00), & AU 200035144 A & US 2002/0010137 A1 & KR 2001103046 A & US 2002/0058309 A1 & EP 1220905 A2 & US 2002/0110859 A1 & US 2002/0115145 A1 & US 2002/0197612 A1 & US 2002/0197674 A1 & US 2002/0198147 A1 & US 2002/0198149 A1 & US 2002/0198366 A1 & KR 2003002292 A	1-8, 45-65
X	WO 01/57188 A (Hyseq Inc.), 05 February, 2001 (05.02.01), & AU 200131288 A & AU 200133293 A & AU 200134847 A & AU 200134848 A & AU 200134944 A & AU 200136658 A & AU 200136660 A & AU 200136663 A & AU 200136721 A & AU 200143142 A & AU 200132971 A	9-16, 45-65
X	ADACHI, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 10 July, 2000 (10.07.00), Accession AK007787 & 16 April, 2002 (16.04.02), Accession AK077118	9-16, 45-65
X	Strausberg, R.L. et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Genbank, 04 September, 2001 (04.09.01), Accession BC013497 & 01 February, 2002 (01.02.02), Accession BC022616 & 01 March, 2002 (01.03.02), Accession BC024888	9-16, 45-65
X	WO 01/00638 A2 (Millennium Pharm Inc.), 04 January, 2001 (04.01.01), & AU 200056197 A & EP 1194534 A2	17-20, 45-65
X	ADACHI, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 10 July, 2000 (10.07.00), Accession AK017880	17-20, 45-65
X	Strausberg, R.L. et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Genbank, 29 October, 2001 (29.10.01), Accession BC016252	21-28, 45-65

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08690

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/53312 A1 (Hyseq Inc.), 26 July, 2001 (26.07.01), & AU 200127284 A & EP 1242443 A1 & US 2002/0197679 A1	29-32, 45-65
X	ADACHI, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 16 July, 2001 (16.07.01), Accession AK030584, AK035957 & 16 April, 2002 (16.04.02), Accession AK082495, AK082963, AK080754	29-32, 45-65
X	WO 01/64835 A2 (Hyseq Inc.), 07 September, 2001 (07.09.01), & AU 200138347 A	33-36, 45-65
X	ADACHI, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 10 July, 2000 (10.07.00), Accession AK009771, AK012437	33-36, 45-65
X	WO 01/90357 A1 (Genesis Res. & Dev.Corp.Ltd.), 29 November, 2001 (29.11.01), & AU 200160847 A & US 2003/0040471 A1	37-40, 45-65
X	WO 01/48192 A (Genesis Res. & Dev.Corp.Ltd.), 05 July, 2001 (05.07.01), & AU 200124134 A & US 6380362 B1	37-40, 45-65
X	WO 01/51636 A2 (Incyte Genomics Inc.), 19 July, 2001 (19.07.01), & AU 200129366 A & EP 1246918 A2	41-65
X	Strausberg, R.L. et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Genbank, 01 May, 2002 (01.05.02), Accession BC028869	41-65
X	ADACHI, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 16 July, 2001 (16.07.01), Accession AK043006 & 16 April, 2002 (16.04.02), Accession AK084668	41-65

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/00, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P48/00, 3/04, 3/10, 9/10, 43/00, G01N33/50, 33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/00, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P48/00, 3/04, 3/10, 9/10, 43/00, G01N33/50, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS), Genbank/Geneseq, Swissprot/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kazuhisa Maeda et al., Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue, Gene, Vol.190 (1997) pp.227-235	1-65
Y	Erding Hu et al., AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity, Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 18 (1996) pp.10697-10703	1-65
Y	Sylvain Baulande et al. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA s	1-65

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.09.03

国際調査報告の発送日

07.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進



4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	pecifically expressed in the adipose lineage, Journal of Biological Chemistry, Vol.276, No.36 (2001) pp.33336-33344	
Y	Kee-Hong Kim et al., A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation, Journal of Biological Chemistry, Vol.276, No.14 (2001) pp.11252-11256	1-65
PX	US 2003/032155 A1 (Genentech Inc.) 2003.02.13 (ファミリーなし)	1-8, 45-65
X	WO 00/53758 A2 (Genentech Inc.) 2000.09.14 & AU 200035144 A & US 2002/0010137 A1 & KR 2001103046 A & US 2002/0058309 A1 & EP 1220905 A2 & US 2002/0110859 A1 & US 2002/0115145 A1 & US 2002/0197612 A1 & US 2002/0197674 A1 & US 2002/0198147 A1 & US 2002/0198149 A1 & US 2002/0198366 A1 & KR 2003002292 A	1-8, 45-65
X	WO 01/57188 A (Hyseq Inc.) 2001.02.05 & AU 200131288 A & AU 200133293 A & AU 200134847 A & AU 200134848 A & AU 200134944 A & AU 200136658 A & AU 200136660 A & AU 200136663 A & AU 200136721 A & AU 200143142 A & AU 200132971 A	9-16, 45-65
X	Adachi, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 2000.07.10 Accession AK007787 & 2002.04.16 Accession AK077118	9-16, 45-65
X	Strausberg, R.L. et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Genbank, 2001.09.04, Accession BC013497 & 2002.02.01 Accession BC022616 & 2002.03.01 Accession BC024888	9-16, 45-65
X	WO 01/00638 A2 (Millennium Pharm Inc.) 2001.01.04 & AU 200056197 A & EP 1194534 A2	17-20, 45-65
X	Adachi, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 2000.07.10 Accession AK017880	17-20, 45-65
X	Strausberg, R.L. et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Genbank, 2001.10.29, Accession BC016252	21-28, 45-65
X	WO 01/53312 A1 (Hyseq Inc.) 2001.07.26 & AU 200127284 A & EP 1242443 A1 & US 2002/0197679 A1	29-32, 45-65

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Adachi, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 2001.07.16 Accession AK030584, AK035957 & 2002.04.16 Accession AK082495, AK082963, AK080754	29-32, 45-65
X	WO 01/64835 A2 (Hyseq Inc.) 2001.09.07 & AU 200138347 A	33-36, 45-65
X	Adachi, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 2000.07.10 Accession AK009771, AK012437	33-36, 45-65
X	WO 01/90357 A1 (Genesis Res. & Dev. Corp. Ltd.) 2001.11.29 & AU 200160847 A & US 2003/0040471 A1	37-40, 45-65
X	WO 01/48192 A (Genesis Res. & Dev. Corp. Ltd.) 2001.07.05 & AU 200124134 A & US 6380362 B1	37-40, 45-65
X	WO 01/51636 A2 (Incyte Genomics Inc.) 2001.07.19 & AU 200129366 A & EP 1246918 A2	41-65
X	Strausberg, R.L. et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Genbank, 2002.05.01, Accession BC028869	41-65
X	Adachi, J. et al., RIKEN functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Genbank, 2001.07.16 Accession AK043006 & 2002.04.16 Accession AK084668	41-65